

Universidade da Beira Interior

Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Efeito da testosterona nos canais iónicos a nível vascular

Carla Moraes

O estudo foi realizado nos laboratórios do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, entre Outubro de 2008 e Junho de 2009.

Orientador: Professor Doutor Ignácio Verde

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Ignácio Verde, por me confiar este projecto, pela orientação ao longo do mesmo, assim como pela disponibilidade para prestar apoio na orientação do meu futuro académico. Agradeço também por todo o equipamento e materiais disponibilizados para a prossecução deste estudo.

Agradeço à Mestre Maria Elisa Cairrão, pelos ensinamentos teóricos e práticos que me facultou, pela paciência e disponibilidade demonstrados ao longo da minha adaptação a novas técnicas laboratoriais, e ainda porque me permitiu apreender e desenvolver um verdadeiro trabalho de grupo. As maiores felicidades académicas para a mesma.

Agradeço ao Mestre Manuel Morgado, pelo apoio presente e disponível para esclarecer e ensinar, sempre que se revelou necessário. Para ele, os desejos de um futuro preenchido por todas as suas ambições.

À Professora Doutora Cândida Tomaz, como Directora de Curso, um agradecimento especial por, mais uma vez, se mostrar incansável na defesa e procura das melhores soluções possíveis para a resolução dos problemas que, inevitavelmente, se atravessam no nosso caminho.

Agradeço a todo o pessoal técnico dos laboratórios do CICS, pela prontidão e amabilidade com que recebem e apoiam novos alunos, e pelo trabalho incansável para que tudo esteja nas devidas condições, facilitando em muito o nosso trabalho.

A todos os Professores, colegas e demais investigadores, por todos os ensinamentos, inclusivé os mais simples, que partilham, para a prossecução de trabalhos de investigação que não se querem distantes e isolados, mas sim num comum espaço de Ciência.

Agradeço ao CHCB-EPE, em particular a todo o pessoal médico, de enfermagem e auxiliar da Maternidade, pela amabilidade, gentileza e disponibilidade na colheita de cordões umbilicais, sem os quais seria impossível desenvolver os trabalhos a que me propus.

Uma especial atenção aos colegas de Mestrado 2008-2009, todos eles companheiros desde longa data. Embora com uma compreensível distância a nível de áreas científicas e técnicas, todos lutamos por um objectivo comum, a Ciência. A todos eles as minhas felicitações, e votos de um bom trabalho no futuro.

A todas as Mães que me forneceram voluntariosa e despretensiosamente os cordões umbilicais, os mesmo que, durante aproximadamente 9 meses, os ligaram a algo transcendente no seu percurso de vida, um bebé ansiado e desejado. A todas essas crianças, que tenham todas as condições para se desenvolverem pessoal, humana e profissionalmente.

Índice

Abreviaturas.....	ix
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
Introdução	1
Músculo liso.....	3
1. Organização e estrutura geral do músculo liso	4
2. Morfologia e constituição do cordão umbilical	6
Contração do músculo liso	7
1. Mecanismos	8
2. Regulação da concentração de cálcio intracelular	11
Canais iónicos e potenciais de membrana	13
1. Canais de cálcio	14
2. Canais de potássio.....	17
Hormonas sexuais e a função vascular	22
1. Testosterona	24
2. Dimorfismo entre géneros nas doenças vasculares	25
3. Efeitos não genómicos da testosterona e colesterol.....	26
Justificação e objectivos	30
Materiais e métodos.....	32
1. Recolha de tecidos	33
2. Cultura de células	33
3. Patch clamp. Princípios e configurações	34
4. Protocolos e técnicas usadas nas A7r5	37
5. Protocolos e técnicas usadas nas células musculares lisas da artéria umbilical .	38

6. Fármacos	41
7. Apresentação dos dados e tratamento estatístico	41
Resultados.....	42
1. Efeito da testosterona e colesterol na $I_{Ca,L}$ nas A7r5.....	43
2. Efeito da testosterona e colesterol na I_K nas A7r5.....	44
3. Efeito da testosterona nos I_{CNG} nas células musculares lisas da artéria umbilical humana	46
Discussão dos resultados	48
Conclusões.....	53
Bibliografia.....	55
Anexos.....	64
The vasorelaxant effect of testosterone and cholesterol in rat aorta is due to L-type calcium channels inhibition	65

Índice de figuras

Figura 1 – Corte transversal de um cordão umbilical	6
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura geral de uma artéria.	6
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de regulação da contracção do músculo liso.	9
Figura 4 – Ilustração esquemática mostrando a localização dos diferentes tipos de canais envolvidos na regulação do cálcio intracelular.	12
Figura 5 – Representação esquemática da constituição de um canal de cálcio dependente de voltagem.	16
Figura 6 – Forma típica das correntes dos K_V	18
Figura 7 – Forma das correntes dos BKCa na configuração <i>Whole cell</i> e <i>single channel</i>	19
Figura 8 – Forma da corrente de K_{ATP} após exposição a glibenclamida e pinacidil.	20
Figura 9 – Formas de corrente dos K_{ir}	21
Figura 10 – Esquema representativo dos diversos passos da biossíntese das hormonas sexuais.	23
Figura 11 – Representação esquemática do selo entre a membrana plasmática e a micropipeta.	35
Figura 12 – Representação ilustrativa dos procedimentos que levam às diferentes configurações do <i>patch clamp</i>	36
Figura 13 – Curvas típicas de corrente de cálcio.	37
Figura 14 – Representação esquemática dos diferentes domínios que formam o canal de CNG.	39

Índice de tabelas

Tabela 1 – Tabela resumo de diferentes estudos realizados para analisar o efeitos da testosterona nos canais de potássio.....	28
Tabela 2 – Tabela resumo de diferentes estudos realizados para analisar o efeitos da testosterona nos canais de cálcio.	29
Tabela 3 – Efeito do colesterol e da testosterona na I_K basal nas A7r5.....	46
Tabela 4 – Efeito da testosterona na I_{CNG} basal nas células musculares lisas da artéria umbilical	47

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Efeito do colesterol e da testosterona nas $I_{Ca,L}$ basais em células A7r5.	43
Gráfico 2 – Efeito do colesterol e da testosterona nas $I_{Ca,L}$ basais em células A7r5 pré-estimuladas com BAY K8644	44
Gráfico 3 – Efeito de diferentes inibidores de canais de potássio na I_K basal nas células A7r5.....	45

Abreviaturas

ANP – Péptido natriurético atrial

APM – Apamina

AR – Receptor de androgénios

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – Adenosina trifosfatase

BAY K8644 – Ácido metiléster-1,4,-Dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4- [2-(triflourometil)fenil]piridina-3-carboxílico

BRL-55834 – 3,4-dihidro-2,2-dimetil-4-(oxopiperidina-1-il)-6-pentafluoroethyl-2H-1-benzopirano-3-ol

BKCa – Canais de potássio activados por cálcio de alta condutância

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica

CBF – Fluxo sanguíneo coronário

cGMP – Guanosina monofosfato cíclica

CNG – Canais activados por nucleótidos cíclicos

CsCl – Cloreto de cézio

CsOH – Hidróxido de cézio

DAG – Diacilglicerol

DMEM/F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DHEA – Desidroepiandrosterona

DHEAS – Sulfato de desidroepiandrosterona

DHP – Dihidropiridina

DHT – Dihidrotestosterona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E.E.M. – Erro estatístico médio

EGTA – Ácido etilenoglicol tetra-acético

Em – Potencial de membrana

ER – Receptor de estrogénios

Gli – Glibenclamida

GTP – Guanosina trifosfato

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietyl-1-piperazineetanosulfónico)

HERS – Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study

HUA – Artéria umbilical humana

IBTX – Iberotoxina

I_{Ca,L} – Correntes de canais de cálcio do tipo L

I_K – Correntes de canais de potássio

Ins(1,4,5)P₃R – Receptor de IP₃

IP₃ – Inositol 1,4,5-trifosfato

K_{ATP} – Canais de potássio sensíveis ao ATP

K_d – Constante de dissociação

K_{Ca} – Canais de potássio activados por cálcio

K_{ir} – Canais de potássio rectificadores de correntes de entrada

K_V – Canais de potássio operados por voltagem

L-NAME – L-arginina-metiléster

LTCC – Canais de cálcio tipo L

MLC – Cadeia leve de miosina

MLCK – Cinase da cadeia leve de miosina

Na-ATP – Sal dissódico de adenosina trifosfato

Na-GTP – Sal dissódico de guanosina trifosfato

NCX – Bomba sódio/cálcio

NO – Óxido nítrico

OSN – Neurónio sensitivo olfativo

PKA – Proteína cinase dependente de cAMP ou proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PKG – Proteína cinase dependente de cGMP ou proteína cinase G

PLC – Fosfolipase C

PMCA – Cálcio ATPase da membrana plasmática

PIP₂ – Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato

PR - Receptor de progesterona

ROCCs – Canais de cálcio operados por receptores

RYR – Canal de cálcio sensível à rianodina

SERCA – Cálcio ATPase retículo sarcoplasmático

SHBG – Globulina ligadora de hormonas sexuais

SKCa – Canais de potássio activados por cálcio de pequena condutância

SOCCs – *Store-operated calcium channels*

SR – Retículo sarcoplasmático

STOCs – Correntes de saída transientes

SURs – Receptores sulfonilureia

TEA – Tetraetilamónio

VOCCs – Canais de cálcio dependentes de voltagem

VSM – Músculo liso vascular

VSMC – Células do músculo liso vascular

WHI – Women's Health Initiative

WT – *Wild-type*

4-AP – 4-aminopiridina

Diversos estudos indicam que o risco de desenvolvimento de Doença Arterial Coronária e Hipertensão é superior nos homens do que em mulheres pré-menopausa. Postula-se que seja resultado de efeitos desfavoráveis da hormona testosterona. No entanto esta mostrou ter efeitos não genómicos vasodilatadores, que podem estar envolvidos num efeito protector, mas este assunto ainda não está clarificado.

Foi estudado a acção da testosterona e do colesterol nos canais de cálcio tipo L e nos canais de potássio nas células A7r5. O efeito da testosterona nos canais activados por nucleótidos cíclicos foi também estudado nas células musculares lisas da artéria umbilical humana. Para tal foi utilizado um sistema de *patch clamp*. A testosterona e o colesterol inibiram as correntes de cálcio tipo L, tanto basais como estimuladas por Bay K8644, de forma concentração-dependente. As correntes de potássio não sofreram alterações significativas. A testosterona foi também capaz de activar as correntes de canais de CNG.

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que a testosterona e colesterol induzem relaxação nas células de músculo liso de aorta de rato. Estes dados sugerem que estes esteróides partilham um mecanismo de acção comum nestas células, estando nele envolvido a inactivação dos canais de cálcio, LTCCs.

Nas células do músculo liso vascular da artéria umbilical humana verificou-se um aumento do cGMP, indicando que o mecanismo envolvido na relaxação pela testosterona envolve a via do cGMP.

Palavras chave: Testosterona; Colesterol; Canais de cálcio tipo L, Canais de potássio; Canais operados por nucleótidos cíclicos, Artéria umbilical humana; A7r5.

Abstract

Several studies point out the increased risk in men versus pre-menopause women on developing coronary artery disease and hypertension. This is, nowadays, seen as a result of unfavourable effects of testosterone. However, this hormone showed non-genomic vasodilator effects which may be involved in some kind of protection, yet this matter isn't clarified.

We studied the action of testosterone and cholesterol on A7r5 cells L-type calcium channels and potassium channels. The effect of testosterone on cyclic nucleotide activated channels has been also studied, using smooth muscle cells from human umbilical artery. To do this, we used a *patch clamp* system. Testosterone and cholesterol inhibited L-type calcium channels, basal as well when stimulated with Bay K8644, in a concentration-dependent way. Potassium currents haven't suffered significative changes. Testosterone was also able to activate CNG channels currents.

According to these results, we can say that testosterone and cholesterol induce relaxation in rat aorta (muscle?) cells. These data suggest that these steroids share a common mechanism of action on rat aorta, being involved the inactivation of calcium channels, the LTCC's.

On vascular smooth muscle cells from human umbilical artery was identified an increase of cGMP, showing that the mechanism involved in testosterone induced relaxation uses cGMP pathway.

Keywords: Testosterone, Cholesterol, L-type calcium channels, Potassium channels, Cyclic nucleotide operated channels, Human umbilical artery, A7r5

Introdução

Diversos são os estudos que indicam que o risco de desenvolvimento da Doença Arterial Coronária e Hipertensão é superior nos homens do que nas mulheres pré-menopausa [10, 11]. No entanto, por volta dos 65 anos de idade as mulheres apresentam o mesmo risco de sofrer de disfunções cardíacas que os homens [12], sendo este facto visto como o resultado de efeitos desfavoráveis da hormona testosterona [13]. Contudo, numerosos estudos clínicos e epidemiológicos apresentam resultados controversos na relação entre a testosterona e as doenças cardiovasculares. Por exemplo, baixos níveis de testosterona nos homens estão positivamente correlacionados com inúmeros factores de risco na doença coronária [13]. Evidências suportam também um efeito benéfico da testosterona no perfil lipídico e contra a formação aterosclerótica [13, 14]. Para além de que, uma infusão aguda intra-coronária ou intravenosa de testosterona resulta em melhorias na isquémia do miocárdio [15].

Músculo liso

O tecido muscular liso distribui-se ubiquamente, estando presente em quase todos os órgãos nos quais desempenha funções essenciais [16].

O músculo liso tem a capacidade de desenvolver força ou compressão para conferir motilidade ou alterar as dimensões de um órgão. No entanto, na ausência de esqueleto, o músculo liso tem também a capacidade de preservar e manter as contrações tónicas para que as dimensões dos órgãos sejam preservadas. Por exemplo, os vasos sanguíneos têm de ser capazes de manter pressão sanguínea [16].

O músculo liso é sujeito a vários estímulos de ordem mecânica, hormonal e neuronal [17]. Embora se possam fazer generalizações no que diz respeito a muitas das características deste tecido há que ter em conta a sua grande diversidade no que diz respeito à estrutura e propriedades das suas células, bem como à sua organização no tecido. Esta diversidade permite que exista um elevado grau de especialização para as diferentes necessidades dos diversos órgãos e condições fisiológicas [18].

Nos últimos anos tem havido um enorme avanço no que diz respeito à elucidação da fisiologia do músculo liso, no entanto, muitos fenómenos envolvendo as interacções moleculares das proteínas contrácteis e das proteínas estruturais são ainda desconhecidos.

1. Organização e estrutura geral do músculo liso

O músculo liso é composto por células fusiformes, os miócitos, com um comprimento de 15 a 200 μm e 5 a 10 μm de diâmetro ao centro, apresentando um único núcleo central [18].

As células deste tipo de tecido têm vários tipos de filamentos no citoplasma: os filamentos densos contendo principalmente miosina, os filamentos finos contendo principalmente actina e os filamentos intermédios que consistem principalmente de vimentina [19-21]. Os filamentos intermédios encontram-se ancorados à membrana plasmática ou aos corpos densos dispersos na célula. Os miofilamentos de actina ligam-se aos filamentos intermédios. Os filamentos intermédios e os corpos densos formam o

citoesqueleto intracelular, que leva ao encurtamento da célula quando os miofilamentos de actina e miosina deslizam uns sobre os outros durante a contracção [21].

O músculo liso pode ser genericamente dividido em dois tipos: o músculo liso unitário ou visceral e o músculo liso multiunitário. O primeiro é mais comum que o segundo, encontrando-se normalmente em túnicas envoltivas de órgãos ocos, constituindo o músculo liso dos tractos digestivo, reprodutor e urinário [16]. Este tipo de músculo liso apresenta uma actividade sincronizada, respondendo como um todo em resposta a uma estimulação. Este facto deve-se às *Gap junctions* que permitem que os potenciais de acção que ocorrem numa célula sejam propagados para outras células por correntes locais [22].

A actividade contráctil deste tipo de tecido pode ser alterada pelo sistema nervoso, hormonas e factores locais, através de uma variedade de mecanismos. Este tipo de tecido ocorre em algumas artérias de maior calibre, nas veias aéreas pulmonares e na íris, por exemplo [23]. Uma característica importante deste tipo de tecido é que a contracção pode ser induzida pelo estiramento do músculo [18].

O músculo liso multiunitário encontra-se em camadas nas paredes dos vasos sanguíneos, ou em pequenos feixes como nos músculos erectores dos pêlos e na íris, ou ainda em células isoladas como na cápsula do baço [22]. Estas células contraem-se, habitualmente, apenas quando estimuladas por nervos ou hormonas. Este tipo de músculo não apresenta ou possui poucas *Gap junctions*, sendo enervados por um único terminal nervoso [18]. As hormonas circulantes podem aumentar ou diminuir a actividade contráctil, mas o estiramento não induz contracção neste tipo de músculo [23]. O músculo liso nas grandes vias aéreas e em grandes artérias são exemplos deste tipo de músculo [17].

O músculo liso dos órgãos ocos mantém um nível de contracção contínuo, passivo e estável designado por tónus, sendo este último essencial para manter a funcionalidade dos órgãos ocos como, por exemplo, o fluxo de sangue através de um tecido [22]. O tónus do músculo liso depende de vários factores intrínsecos e extrínsecos. Os factores intrínsecos incluem a resposta ao estiramento, metabolitos locais, compostos secretados localmente (como o NO nos vasos sanguíneos) e a temperatura. Nos factores extrínsecos está incluída a actividade dos nervos autónomos e das hormonas circulantes [22].

2. Morfologia e constituição do cordão umbilical

Em mamíferos com placenta, o cordão umbilical estabelece a ligação entre o feto em desenvolvimento e a placenta. Este é formado na quinta semana do desenvolvimento embrionário e tem a função de proteger os vasos ao longo da gravidez [24]. Durante o desenvolvimento embrionário o cordão umbilical provém do feto e, em humanos, normalmente contém duas artérias e uma veia, rodeadas por um tecido conjuntivo

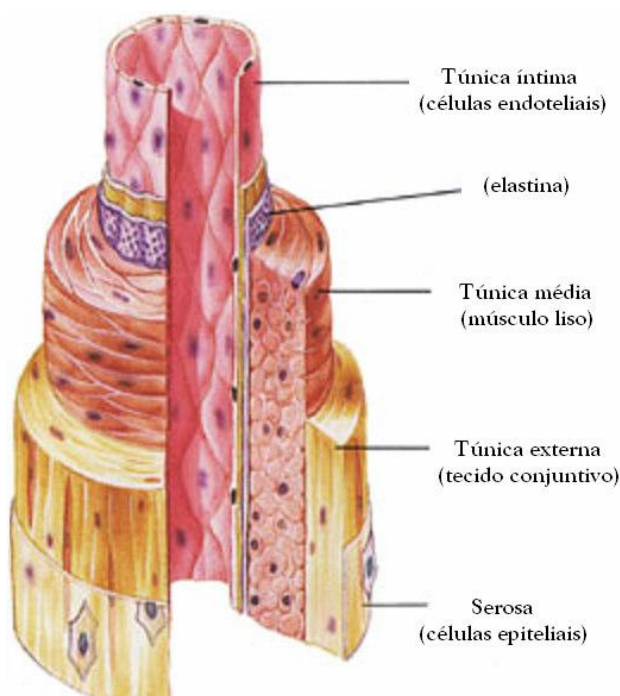


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura geral de uma artéria [1].

A artéria umbilical humana (HUA) é constituída, do interior para o exterior, por uma monocamada endotelial e tecido muscular, não existindo qualquer camada sub-endotelial ou lâmina elástica adjacentes. Está, assim, o endotélio em contacto directo com o tecido muscular. A HUA é composta por fibras de músculo liso dispostas numa camada mais interna longitudinal e uma mais externa, circular (figura 2). Numa secção transversal, a camada muscular interna apresenta dobras que tornam o lúmen da HUA irregular. Não existe qualquer adventícia definitiva ou vasa vasorum, sendo a camada muscular mais externa contínua com a geleia de Warton [24].

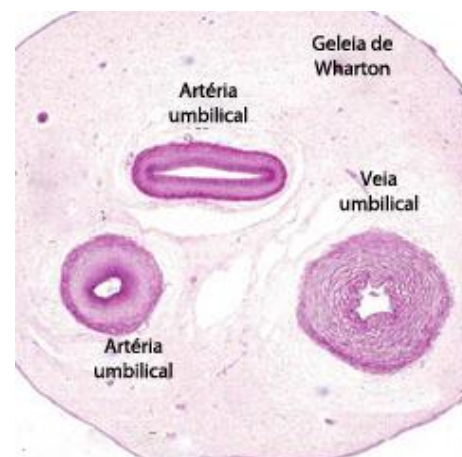


Figura 1 – Corte transversal de um cordão rico em umbilical [2].

proteoglicano conhecido como geleia de Warton (figura 1). Esta geleia apresenta propriedades físicas que a tornam resistente à compressão e à torção, protegendo o sistema vascular essencial entre o feto e a placenta [24].

A veia umbilical fornece sangue rico em nutrientes e oxigenado proveniente da placenta. Por outro lado, as artérias retornam sangue desprovido de nutrientes e desoxigenado. Não existem fibras nervosas ou vasos linfáticos no cordão umbilical [24].

Contração do músculo liso

1. *Mecanismos*

Em condições fisiológicas, o papel principal das células musculares lisas é gerar força de contração, sendo a sua intensidade regulada por diversos factores extracelulares físicos e químicos [7].

A contração do músculo liso é regulada pelo nível de cálcio intracelular e pela sensibilidade ao cálcio dos elementos contrácteis, em resposta a alterações no ambiente externo à célula. Em resposta a um estímulo específico, mecânico ou farmacocinético, a concentração de cálcio aumenta e este liga-se à calmodulina alterando a sua conformação. Esta alteração permite a interacção com a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), deslocando a sequência auto-inibitória da MLCK, que fosforila a miosina. A exposição dos sítios activos promove a ligação cíclica da porção globular da miosina com a actina, seguida da mudança do ângulo de orientação do complexo actomiosina, que promove o deslizamento de um filamento sobre o outro. O desenvolvimento da tensão do músculo depende da activação da miosina pela fosforilação directa e a activação da actina, pela saída do complexo tropomiosina/caldesmon, induzida pelo complexo cálcio/calmodulina. A energia deste processo é fornecida pelo ATP, libertada pela miosina ATPase após a sua interacção com a actina [25].

As contrações do músculo liso vascular são do tipo tónico, desenvolvendo-se lentamente e mantendo um tônus constante. O tônus basal do músculo liso vascular é responsável pela manutenção da resistência periférica [26]. O cálcio citosólico aumenta pela libertação de cálcio proveniente das reservas intracelulares situadas no retículo sarcoplasmático (SR) [27], e pela entrada de cálcio extracelular pelos canais de cálcio [28]. Geralmente, a vasoconstrição é iniciada nos receptores de membrana, que ligam agonistas como a norepinefrina, a angiotensina II e a endotelina, acoplados à proteína G. A activação destes receptores inicia uma cascata de sinalização, que activa a fosfolipase C, a qual gera os segundos mensageiros DAG e IP₃. A ligação do IP₃ aos receptores no SR resulta na libertação de cálcio para o citosol. O DAG, juntamente com o cálcio, activa a proteína cinase C (PKC) que fosforila proteínas alvo [26].

Diversas isoformas da PKC, incluindo a α , β , δ e ξ , foram identificadas no VSM de acordo com a sua dependência de cálcio. A activação clássica da PKC (α e β) requer cálcio, DAG e fosfatidilserina, em comparação, com mais recentemente descoberta, a PKC (δ) requer DAG e fosfatidilserina, mas não cálcio e a atípica PKC (ξ) que é activada apenas por fosfatidilserina. A endotelina e angiotensina mostraram inibir as correntes de K_V via activação da PKC independente de cálcio [29, 30]. Em muitos dos casos, a PKC apresenta efeitos promotores da contracção como a fosforilação dos LTCCs ou outras proteínas que regulam as ligações cruzadas entre a miosina e a actina [31]. Os LTCCs na membrana abrem ainda em resposta a despolarizações causadas por estiramento da célula muscular lisa [32].

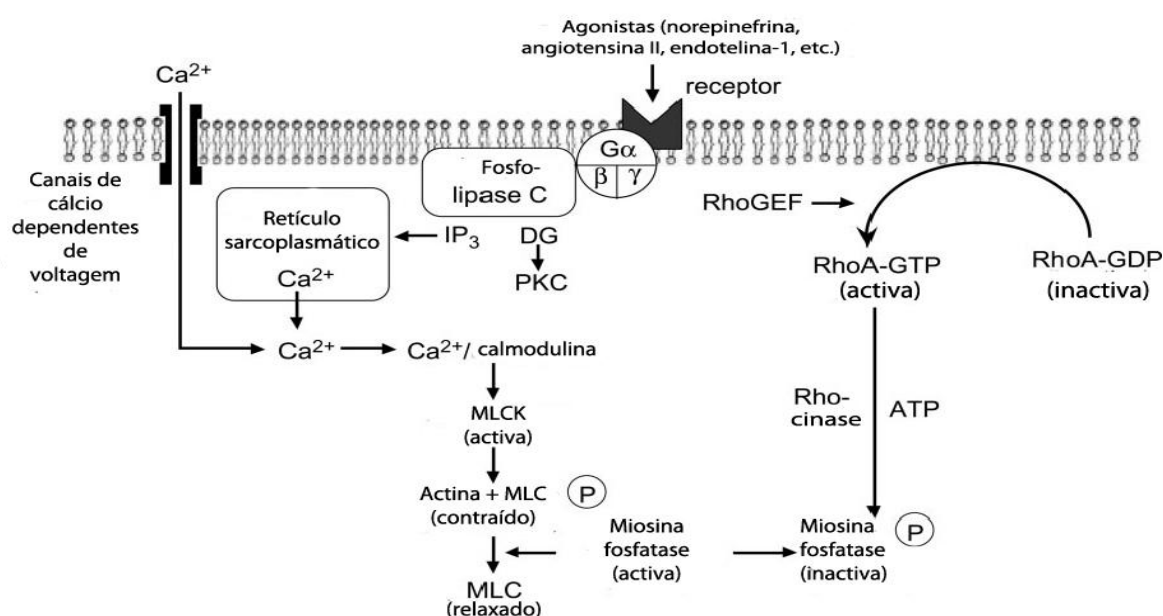


Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de regulação da contracção do músculo liso. A ligação de um agonista ao seu receptor, que activa a fosfolipase C, via proteína G. A activação da fosfolipase C gera dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). Posteriormente, o DAG activa a PKC e o IP3 o seu receptor no retículo sarcoplasmático levando à libertação de cálcio. Este cálcio, ao ligar-se à calmodulina activa, activa uma cinase (MLCK) que fosforila a cadeia leve da miosina, iniciando assim a contracção. MLC – Cadeia leve de miosina; MLCK – Cinase da cadeia leve de miosina (adaptado de [7]).

Um vasto número de vasoconstritores inibe a actividade dos canais de potássio, que contribuem para a despolarização de membrana [33]. Mais recentemente, a inibição dos

K_V pelo tromboxano A_2 foi reportada como envolvendo a PKC ξ [34]. Apesar da inibição dos BKCa independente da PKC pela angiotensina já ter sido demonstrada nas artérias coronárias [35], um estudo mais recente indica que a fosforilação pela PKC destes canais os inibe no VSM [34]. No entanto, o papel preciso das diferentes isoformas da PKC não foi ainda totalmente esclarecido.

No VSM, vários vasoconstritores como a angiotensina, a endotelina, a vasopressina, a noradrenalina, a histamina, a serotonina e o neuropéptido Y inibem a função dos K_{ATP} via activação da PKC (principalmente pela PKC independente de cálcio) [9]. O efeito inibitório destes compostos nos K_{ir} ainda não foi completamente clarificado. Dados recentes mostram que a endotelina e a angiotensina inibem a função dos K_{ir} e que esta está bastante associada com a activação da PKC dependente de cálcio [9, 36]. Consistente com estes dados, foi sugerido que os microvasos que possuem K_{ir} expressam níveis mais elevados de PKC α e baixos níveis de PKC δ [37].

Diversos tipos de canais de potássio são activados por vasodilatadores, como o péptido relacionado com o gene da calcitonina, os agonistas β -adrenérgicos, o péptido vasoactivo intestinal e a adenosina, que activam a adenil ciclase, aumentando provavelmente a concentração de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) que por sua vez activa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA ou proteína cinase A) [33]. Os K_{ATP} no VSM são os responsáveis por muitas das funções vasodilatadores através da PKA, incluindo o péptido relacionado com o gene da calcitonina, a adenosina e a isoprenalina [38]. Os BKCa são também activados por vasodilatadores acoplados com a PKA. No entanto, muitos dos estudos dirigiram a sua atenção para a activação via receptores β -adrenérgicos [33]. Embora a regulação dos K_V por vasodilatadores tenha sido bastante ignorada, a estimulação β -adrenérgica mostrou activar estes canais através da PKC em VSMCs de coelho [33].

Alguns dos vasodilatadores actuam através da guanil ciclase levando, primeiramente, ao aumento da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) e à consequente activação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG ou proteína cinase G) [33]. A activação da PKG pelo óxido nítrico (NO) ou nitrovasodilatadores resulta na activação dos BKCa nas células isoladas do VSM das artérias coronárias e cerebrais [39]. Existem também algumas evidências de que a PKG pode activar certos K_{ATP} em certos tipos de tecidos. O péptido natriurético atrial (ANP) aumenta os níveis de cGMP intracelulares em

VSMCs em cultura, levando à activação individual de K_{ATP} [40]. Para além disso, o NO induz uma corrente de potássio sensível à glibenclamida no VSM, sugerindo que tanto o aumento de cGMP como a estimulação da PKG leva a uma activação dos K_{ATP} [41].

2. Regulação da concentração de cálcio intracelular

A entrada de cálcio na célula muscular lisa pode ser activada por diferentes mecanismos: (1) despolarização da membrana que origina a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem; (2) activação induzida por agonistas de receptores das células, como neurotransmissores e hormonas, com ou sem alteração do potencial de membrana (E_m). Este processo pode envolver o influxo de cálcio por canais de cálcio operados por receptor, a libertação de cálcio dos depósitos intracelulares (SR) e/ou a sensibilização das proteínas contrácteis ao cálcio. Este último mecanismo pode ou não estar associado a um aumento de cálcio intracelular [26].

Existem dois tipos de mecanismos de libertação de cálcio do SR: (1) a libertação de cálcio induzida pelo cálcio; (2) libertação de cálcio induzida pelo IP_3 [26]. Os canais de cálcio sensíveis à rianodina (RyR) e os receptores de IP_3 são os canais responsáveis por esta libertação de cálcio [27] (figura 4). A sequestração de cálcio para o SR, contra o gradiente de concentração, é mediada pela cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) [42].

Para o controlo do cálcio intracelular contribuem também a cálcio-ATPase da membrana plasmática (PMCA) e a bomba Na^+-Ca^{2+} [42]. Estes dois canais removem continuamente cálcio do meio intracelular para o meio extracelular. A afinidade da PMCA para o cálcio é aumentada pela calmodulina e pelas cinases PKA e PKG. Esta é geralmente a via mais importante de efluxo de cálcio nas VSMC [26].

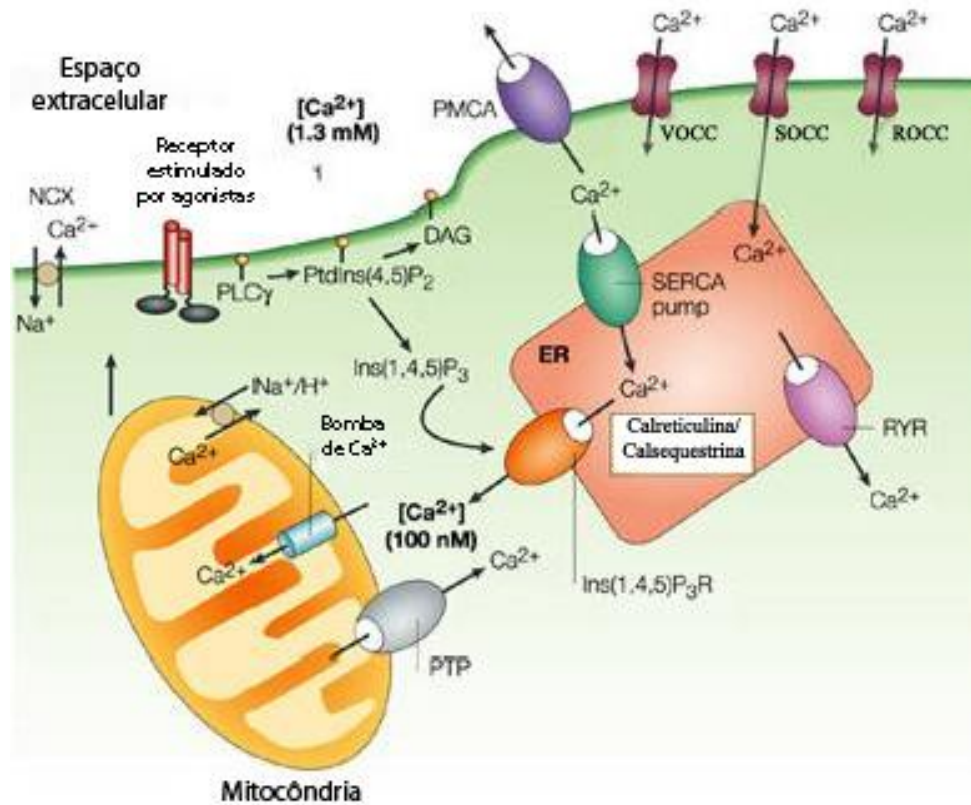


Figura 4 – Ilustração esquemática mostrando a localização dos diferentes tipos de canais envolvidos na regulação do cálcio intracelular. NCX – Bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; PLC – Fosfolipase C; PMCA – Cálcio ATPase da membrana plasmática; VOCC – Canais de cálcio operados por voltagem; SOCC - *Store-operated calcium channels*; ROCC – Canais de cálcio operados por receptor; DAG – Diacilglicerol; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$ – Receptor do inositol trifosfato; ER – Retículo endoplasmático; SERCA – Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático; RYR – Receptor sensível à rianodina (adaptado de [43]).

Canais iónicos e potenciais de membrana

Os iões não se encontram uniformemente distribuídos pelos espaços intra e extracelulares. Esta assimetria, associada com a diferente permeabilidade da membrana plasmática a cada espécie iónica, é responsável pela criação de um potencial de membrana em repouso. Este potencial é devido, principalmente, às distribuições e permeabilidade de quatro iões: o K^+ , o Cl^- , o Na^+ e o Ca^{2+} , sendo o K^+ e o Cl^- os mais importantes no estado de repouso [22].

O E_m do músculo liso em repouso é, normalmente, cerca de -50 a -60 mV [44], que é aproximadamente 30mV mais elevado que o potencial de equilíbrio do K^+ . Este valor de E_m deve-se à permeabilidade do sódio ser cerca de 1/5 da permeabilidade do potássio [45]. Quando o músculo liso gera um potencial de acção, a despolarização depende do influxo de Na^+ e do Ca^{2+} . No entanto, a contribuição exacta destes iões varia consoante o tipo de músculo liso. Em alguns, o potencial de acção pode desenvolver uma fase *plateau*. No músculo liso unitário algumas células actuam como células *pacemaker* e apresentam flutuações espontâneas de E_m conhecidos como *slow waves* [18]. De acordo com estudos já efectuados, pensa-se que a interacção entre os canais de K^+ e Ca^{2+} é o factor determinante dos níveis de excitação-contracção nas células musculares lisas [26, 27, 46-48].

É importante referir que nem todos os músculos lisos requerem que ocorra um potencial de acção para contraírem [18, 22].

1. Canais de cálcio

O cálcio é um segundo mensageiro ubiquamente presente que apresenta um papel essencial em muitas funções fisiológicas. A membrana plasmática das células musculares lisas possui diferentes canais de cálcio. Estes quando activados, permitem a entrada de cálcio nas células, os mais importantes são os canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCCs) e os canais de cálcio não selectivos operados por receptor (ROCCs) [42]. Para além destes, estas células têm diferentes mecanismos para reduzir os níveis de cálcio citosólico. Sendo estes, a bomba de cálcio ATPase, que produz um efluxo de cálcio, a bomba de Na^+/Ca^{2+} que contribui tanto para a entrada como saída de cálcio e a ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), que estimula a

acumulação de cálcio neste organelo intracelular. A mitocôndria e o núcleo contribuem também para a concentração livre de cálcio citosólico, no entanto, o seu papel é menos importante e não é bem conhecido [26, 42].

A diversidade de respostas celulares acopladas com a entrada de cálcio através dos canais iónicos dependentes de voltagem é reflectida pelo número distinto de genes que codificam este tipo de canais. Diversos tipos de canais de cálcio dependentes de voltagem foram já identificados, electrofisiologica e geneticamente, e foram designados de L, N, P/Q, R e T [26]. Embora o canal de cálcio tipo T não esteja bem caracterizado a nível molecular, todos os outros tipos de canais dependentes de voltagem consistem num poro complexo formado por uma subunidade α_1 de 200 a 250kDa, a subunidade $\alpha_2\delta$ com aproximadamente 140kDa e a subunidade intracelular β de 55 a 72kDa [26].

As células musculares lisas expressam dois tipos principais de canais de cálcio dependentes de voltagem, os canais de cálcio tipo L (LTCC) e os canais de cálcio tipo T [47, 49, 50]. Outra classe de canais iónicos dependentes de cálcio, os canais de cálcio não específicos, tem sido descrita numa grande variedade de células, como cardiomiócitos, células secretoras, neurónios, neutrófilos e células epiteliais. Este tipo de canais apresenta uma fraca selectividade para diversos catiões monovalentes e são activados pelo cálcio intracelular [51, 52]. Raiongo *et al.* [52] determinaram a presença destes canais na artéria umbilical humana (HUA) e sugeriram um papel importante destes canais no influxo de cálcio e na contracção destas artérias.

1.1. Canais de cálcio tipo L (LTCCs)

Os LTCCs são os canais de cálcio dependentes de voltagem mais bem caracterizados. Estes foram primeiramente reconhecidos como sendo essenciais na associação excitação/contracção nas células do músculo esquelético, cardíaco e liso [53].

Os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L medeiam a entrada de cálcio induzida por despolarização em células excitáveis, incluindo as células musculares, controlando uma larga variedade de processos fisiológicos cruciais. Para desempenhar estas diversas funções, quatro isoformas de LTCCs estão envolvidas [53].

As isoformas dos LTCCs diferem consideravelmente no que diz respeito às suas propriedades de activação/inactivação e expressão nos diferentes tecidos. Estas são intrínsecas das suas subunidades $\alpha 1$ e das subunidades acessórias $\alpha 2\delta$ e β que formam um canal funcional complexo [53] (figura 5).

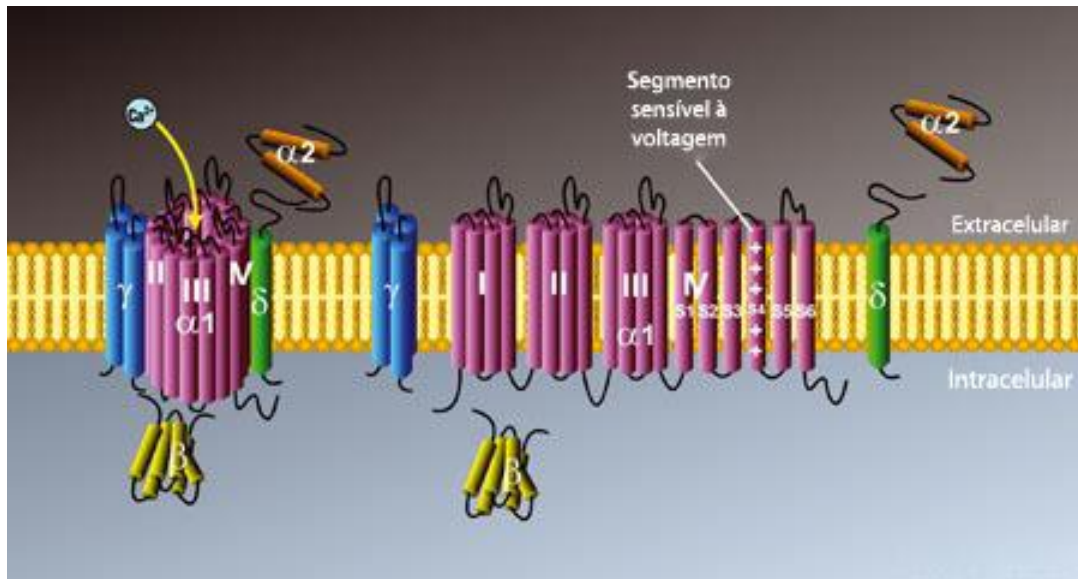


Figura 5 – Representação esquemática da constituição de um canal de cálcio dependente de voltagem.

Em artérias, o aumento da pressão intraluminal causa uma despolarização gradual das VSMCs para valores de E_m superiores aos fisiológicos. Os vasoconstritores como a angiotensina II e a uridina trifosfato aumentam a actividade dos LTCCs causando a despolarização da membrana e activação da PKC [28].

1.2. Canais de cálcio tipo T

Os canais de cálcio tipo T são activados por baixas voltagens e são caracterizados pela sua rápida activação e inactivação por correntes transientes de cálcio, uma condutância

unitária pequena e uma insensibilidade para os agentes que bloqueiam os LTCCs e outros canais de cálcio de alta voltagem [47]. Têz membros fazem parte da família dos canais de cálcio tipo T., no entanto, estudos iniciais electrofisiológicos foram incapazes de distingui-los. Este facto deve-se aos três tipos de canais serem funcionalmente semelhantes relativamente às suas propriedades cinéticas e papel funcional no VSM [47, 54]. Pela falta de um inibidor mais específico, o mibefradil é o inibidor mais utilizado como sendo parcialmente “selectivo” para estes canais [47].

2. *Canais de potássio*

Os canais de potássio são importantes reguladores do potencial de membrana. Em condições fisiológicas, o E_m do músculo liso é superior ao E_m do potássio. Consequentemente, o aumento da permeabilidade da membrana para o potássio resulta numa corrente de saída que se opõe à despolarização e excitabilidade da célula, ou seja, à contracção [54].

Os canais de potássio exibem uma elevada diversidade funcional e molecular, e influenciam o comportamento eléctrico de cada tipo de tecido. Daí resulta a larga diversidade de actividade eléctrica do tecido muscular liso [54].

A hiperpolarização devido ao efluxo de potássio resulta da abertura dos canais de potássio no músculo liso vascular. Este efeito é seguido pelo fecho dos canais de cálcio dependentes de voltagem, levando à redução da entrada de cálcio e consequente vasodilatação. Em contraste, a inibição dos canais de potássio leva a uma despolarização e vasoconstricção. Quatro tipos distintos de canais de potássio foram identificados nas VSM: canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), canais de potássio activados por cálcio (BKCa), canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais de potássio rectificadores de correntes de entrada (*inward rectifier*, K_{ir}) [55].

2.1. Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V)

A expressão de uma vasta gama de K_V foi já detectada nos VSM. Os K_V abrem e provocam um efluxo de potássio em resposta a uma despolarização da membrana, resultando na repolarização e o retorno ao Em de repouso [54].

A despolarização em pequena escala nas VSMCs leva a um influxo de cálcio através dos LTCCs e a activação da maquinaria de contracção.

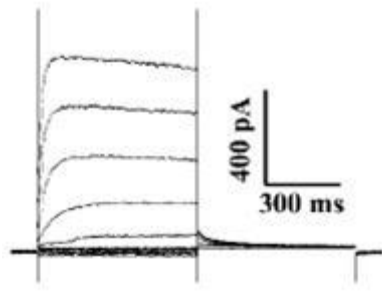


Figura 6 – Forma típica das correntes dos K_V (retirado de [8])

Assim, os K_V funcionam para limitar a despolarização de membrana e manter o tónus vascular de repouso. A inactivação dos K_V pode provocar uma despolarização sustentada (figura 6)[54].

Os vários constituintes da corrente dos K_V foram identificados e os K_V presentes no VSM foram divididos em grupos baseados na sua dependência da voltagem e nas suas propriedades farmacológicas. Até

à actualidade, mais de trinta genes codificadores de várias subfamílias de subunidades α dos K_V estão já descritos. Estruturalmente, as subunidades α dos K_V contêm terminais N e C citoplasmáticos e seis domínios transmembranares (S1-S6) que formam o poro, sendo o domínio S4 responsável pela sensibilidade à voltagem. Muitos dos K_V apresentam propriedades cinéticas e farmacológicas semelhantes, tornando difícil determinar que genes específicos são expressos em determinada célula [56].

O composto 4-aminopiridina (4-AP) tem sido usado em muitos estudos do VSM como um bloqueador dos K_V , para conseguirem separar as correntes de K_V das correntes provocadas por outros canais de potássio. A concentração máxima de 4-AP necessária para uma inibição máxima dos K_V em vários tipos de VSM foi demonstrada como sendo entre 0,3 e 1,1mM. Apesar de a 4-AP não ter efeito nos BKCa ou nos K_{ir} , a inibição dos K_{ATP} foi reportada. Dos vários compostos conhecidos como inibidores da função dos canais de potássio, incluindo o bário a glibenclamida e a iberotoxina, nenhum demonstrou alterar a corrente dos K_V nas concentrações mencionadas [57].

2.2. Canais de potássio activados por cálcio (BKCa)

Os canais de larga condutância (200 a 250 pS) activados por cálcio estão amplamente

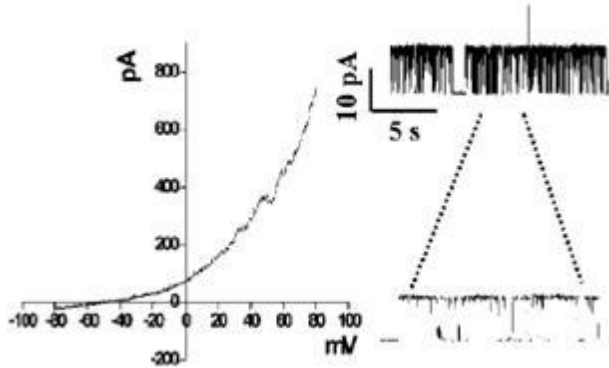


Figura 7 – Forma das correntes dos BKCa na configuração *Whole cell* e *single channel* (Retirado de [6]).

presentes nas VSMCs. Os BKCa, que são activados por alterações nas concentrações de cálcio intracelular e pela despolarização da membrana, pensa-se contribuírem para a manutenção do Em nos vasos sanguíneos [58]

Estudos anteriormente realizados indicam que o efluxo de potássio, que resulta da activação dos BKCa, pode ser

usado para contrariar a despolarização e vasoconstricção induzida por agentes químicos [59]. Tal como os K_V , os BKCa são formados por uma subunidade α e uma subunidade reguladora β , que tem a função de aumentar a sensibilidade do canal para o cálcio. A subunidade α contém seis domínios transmembranares (S1-S6), incluindo o sensor de voltagem S4, que forma o poro. No entanto, a subunidade α é codificada por um único gene (*slo*) e contém uma região transmembranar adicional (S0) no terminal exoplasmático NH_2 [60]. Por outro lado, existem quatro isoformas da subunidade β que podem ser associadas com as subunidades α num ratio de 1:1. Das quatro isoformas a subunidade β_1 é a isoforma mais frequente no VSM [59, 60].

Os BKCa podem ser bloqueados por TEA, iberotoxina e *charybdotoxin* [59]. Destes bloqueadores a iberotoxina é o mais selectivo. A *charybdotoxin* foi já usada como um bloqueador selectivo dos BKCa, no entanto esta também afecta os K_V , assim como os canais de potássio activados por cálcio de intermédia condutância. Os BKCa não são afectados pela glibenclamida, pelo bário ou pela apamina, que também inibem os canais de potássio activados por cálcio de baixa condutância [59].

2.3. Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os K_{ATP} foram primeiramente identificados no músculo cardíaco [61] e, posteriormente, em vários tipos de células incluindo as VSMCs (Figura 8) [55]. Foi demonstrado tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* que o bloqueio dos K_{ATP} leva à vasoconstrição e à despolarização da membrana em diversos tipos de VSM [38, 62, 63]. Também, a inibição dos K_{ATP} leva à paragem da auto-regulação coronária e cerebral [41].

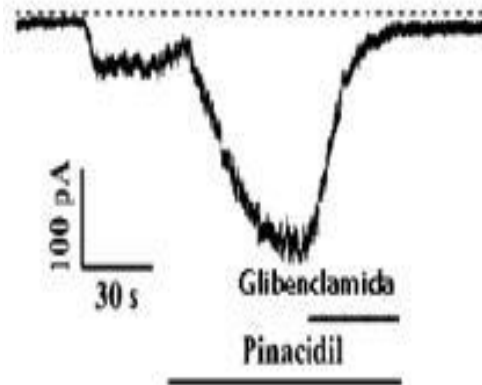


Figura 8 – Forma da corrente de K_{ATP} após exposição a glibenclamida e pinacidil (adaptado de [9]).

Os K_{ATP} são complexos hetero-octaméricos contendo quatro subunidades rectificadoras de corrente de entrada (K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2), juntamente com quatro receptores sulfonilureia (SURs), que são proteínas ligadoras de ATP. A diversidade molecular que existe entre espécies e tecidos em relação aos K_{ATP} deve-se à presença de múltiplas isoformas de SURs [64].

Os K_{ATP} no músculo liso são conhecidos como sendo inibidos pelas drogas anti-diabéticas sulfonliureias, como a glibenclamida e tolbutamida (figura 7) [64]. A glibenclamida é o inibidor frequentemente usado em estudos dos K_{ATP} no músculo liso arterial. O bário externo pode também actuar como um inibidor dos K_{ATP} no músculo liso [65]. Estes canais, tanto no músculo liso como no músculo esquelético, não são afectados pela iberotoxina e são menos sensíveis à TEA.

Existem vários activadores sintéticos dos K_{ATP} como o cromakelím, levromakalím nicorandil, pinacidil, minoxidil, diazoxida e BRL-55834, podendo a vasodilatação induzida por estes agentes ser bloqueada com sucesso pela glibenclamida, na medida em que estudos indicam que estes hiperpolarizam as células no VSM pela sua ligação aos K_{ATP} [65].

2.4. Canais de potássio rectificadores de correntes de entrada (K_{ir})

Os K_{ir} são canais abundantes no músculo liso de vasos de pequeno diâmetro (Figura 8). Embora a exacta função destes canais não esteja ainda completamente descrita, existem duas possibilidades: (1) os K_{ir} poderão contribuir para a manutenção do E_m de repouso e para o tónus de repouso do VSM de vasos de pequeno diâmetro; (2) a activação dos K_{ir} em resposta a um aumento moderado da concentração de potássio extracelular possa

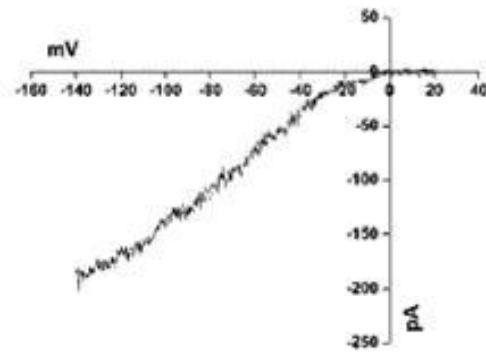


Figura 9 – Formas de corrente dos K_{ir} [5]

causar vasodilatação. A primeira hipótese é suportada por estudos mostrando a contracção de artérias coronárias e cerebrais de pequeno diâmetro em resposta ao bário, um inibidor específico dos K_{ir} [66]. Por outro lado, a segunda hipótese é suportada por estudos que mostraram que a vasodilatação pode ser prevenida pelo bário, mas não pela remoção do endotélio ou por inibidores dos canais de potássio [67].

Os K_{ir} nas VSMCs medeiam correntes de entrada potássio E_m que são negativas relativamente ao E_m do potássio e pequenas correntes de saída para E_m que são positivos relativamente ao E_m do potássio [65]. Tendo em conta que o E_m do VSM é normalmente positivo relativamente ao E_m do potássio, o papel fisiológico do K_{ir} requer uma corrente de saída através do canal.

Os K_{ir} são canais tetraméricos nos quais as subunidades, que contêm apenas dois domínios transmembranares, são codificadas por membros da família de genes K_{ir} [40]. As correntes deste tipo de canais são inibidas por bário nas VSMCs de uma forma dependente de voltagem. De facto, os valores de concentração para inibição máxima mediada por bário aumentam exponencialmente com a hiperpolarização [68]. No entanto, o bário é muito menos eficaz contra os K_{ATP} , os $BKCa$ e os K_V [41]. No entanto, um estudo demonstrou que, para concentrações inferiores a $50\mu M$, o bário actua como inibidor selectivo dos K_{ir} no VSM [38, 69]. O mesmo está descrito para o célio extracelular e, de forma parcial, para o cálcio [69].

Hormonas sexuais e a função vascular

As hormonas sexuais femininas e masculinas são hormonas esteróides com uma semelhança molecular e uma via biossintética comum, sintetizadas nas gónadas e nas glândulas adrenais [70].

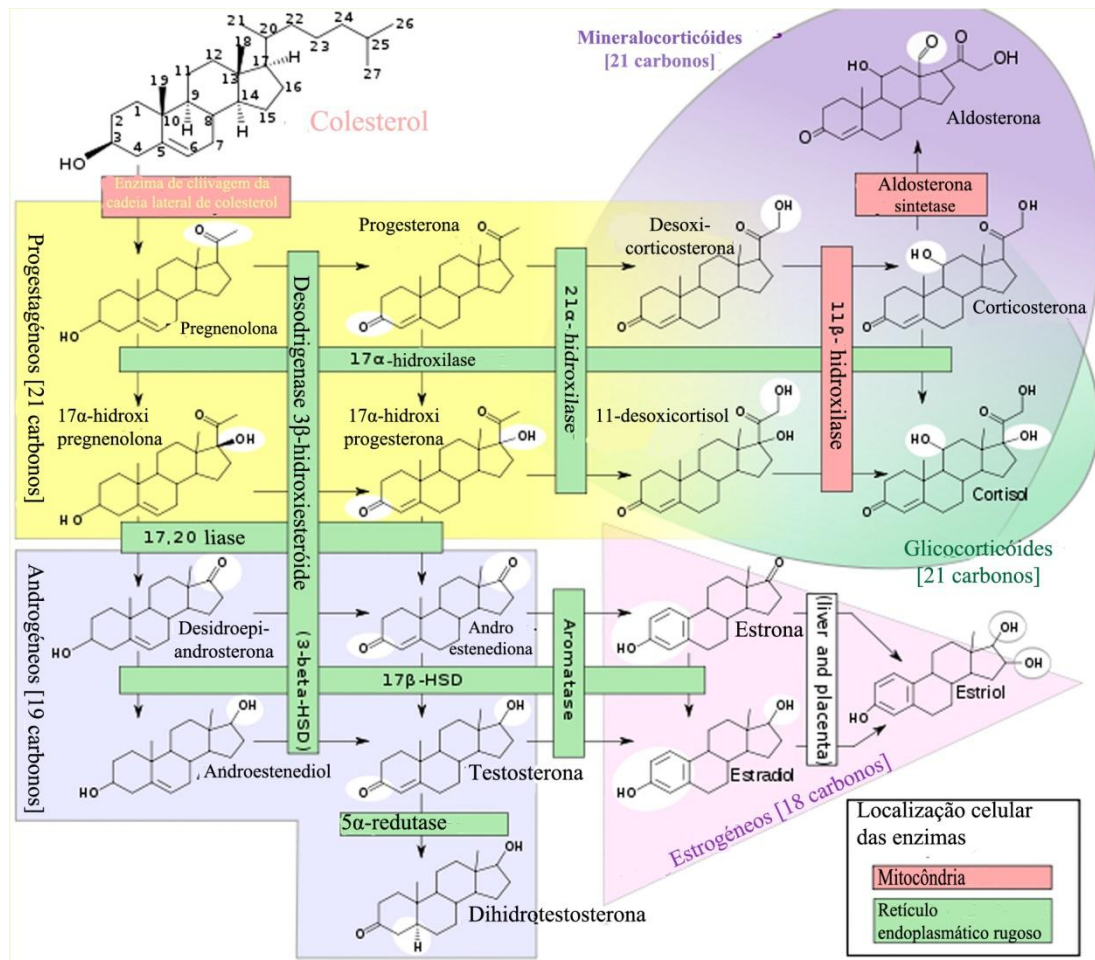


Figura 10 – Esquema representativo dos diversos passos da biossíntese das hormonas sexuais (adaptado de [71]).

O colesterol, que é o precursor comum de todas as hormonas esteróides, é primeiramente convertido em pregnenolona, servindo esta como intermediário para a síntese de androgénios e estrogénios [70].

Os estrogénios são sintetizados a partir dos androgénios pela formação de um anel aromático, sendo esta reacção catalisada pela enzima aromatase [70]. As hormonas esteróides actuam via receptores específicos: receptores de estrogénios (ER β e ER α), receptores de androgénios (AR) ou receptores de progesterona (PR-A ou PR-B) [72].

De uma forma geral, as hormonas esteróides ligam-se ao respectivo receptor, dimerizam e ligam-se a elementos específicos do DNA modelando a transcrição - efeitos genómicos [72]. Recentemente, novos conceitos na sinalização mediada por receptores de hormonas esteróides têm sido mencionados, incluindo activação celular rápida que não envolve a alteração na transcrição de genes – efeitos não genómicos [70].

1. Testosterona

A testosterona é uma hormona esteróide do grupo dos androgénios. Em humanos cerca de 95% é secretada pelas células de Leydig nos homens e pelos ovários nas mulheres, embora pequenas quantidades sejam também secretadas por glândulas adrenais [72]. A sua produção é estimulada pela hormona luteinizante [18]. No geral, um homem adulto produz 4 a 6 vezes mais testosterona que a mulher [73].

No sangue, a testosterona existe tanto na forma livre como ligada a proteínas [73]. Embora cerca de 38% da testosterona se encontre ligada à albumina, a maior proteína responsável pelo transporte de testosterona é a globulina ligadora de hormonas sexuais (SHBG), que liga cerca de 60% da testosterona. Cerca de 2% da testosterona biologicamente activa encontra-se livre na circulação, sendo capaz de entrar nas células e exercer os seus efeitos [74]. Para além disso, a testosterona ligada às proteínas de transporte pode dissociar destas e entrar nos tecidos alvo [73]. A testosterona, nos tecidos, pode ser convertida a di-hidrotestosterona pela actividade da enzima 5- α -redutase. A maioria da testosterona é convertida primeiramente no fígado em vários metabolitos, como a androsterona e a eticolanolona, que após conjugação com o ácido sulfúrico ou o ácido glucurónico, são excretados na urina como 17-cetoesteróides [74].

2. *Dimorfismo entre géneros nas doenças vasculares*

Nos países que possuem estatísticas de mortalidade, as doenças cardiovasculares aparecem como a causa de morte predominante tanto em homens como mulheres [75]. A incidência das doenças cardiovasculares é superior nos homens entre 30-50 anos comparativamente com as mulheres de idade semelhante. Dentro do grupo das mulheres, a incidência de doenças cardiovasculares é superior nas mulheres pós-menopausa [75]. Apesar dos estudos da Heart and Estrogen-Progestin Replacement (HERS), HERS2 e a Women's Health Initiative (WHI) não verificarem efeitos vasculares benéficos na terapia de substituição, outros estudos têm sugerido um efeito benéfico na incidência da doença coronária em mulheres pós-menopausa e sugeriram um putativo efeito vascular das hormonas sexuais femininas [76].

Uma variedade de benefícios, biológicos e fisiológicos, foi também atribuída às hormonas sexuais masculinas. Estudos epidemiológicos e experiências em animais incidindo em androgénios demonstraram efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares [77]. Estudos *in vitro* de Farrukh et al. [78] e de Gupte et al. [79] mostraram que a desidroepiandrosterona (DHEA) actua como vasodilatador pulmonar e inibe a vasoconstrição pulmonar aguda hipóxica, devido em parte à abertura dos canais de potássio. Mais recentemente, Hampl et al. [80] e Bonnet et al. [81] demonstraram que o tratamento com DHEA e sulfato de desidroepiandrosterona (DHEAS) inibe e reverte a hipóxia induzida em ratos, sendo também observado um aumento na expressão e função de canais de potássio activados por cálcio. Dados de estudos posteriores corroboram os dados descritos [82].

A 5α -dihidrotestosterona (DHT), 5β -dihidrotestosterona, androsterona e androstenediona foram também reportadas como capazes de produzir um efeito inibitório rápido e reversível nas contracções dos vasos deferentes de rato. É sugerido um bloqueio do influxo de cálcio pelos LTCCs [83]

3. *Efeitos não genómicos da testosterona e colesterol*

A testosterona actua via mecanismos não genómicos, visto que as suas respostas são imediatas. Estes efeitos não genómicos foram confirmados em estudos com receptores não funcionais de androgénios [84-86], reproduzidas por conjugados de testosterona não permeáveis à membrana [87] e com inibidores de DNA e de síntese e proteínas [88, 89], bem como por antagonistas dos AR [88-91], por inibição da aromatase [90, 92, 93] e inibidores de ER [93, 94].

Nomeadamente, os efeitos vasodilatadores da testosterona estão bem estabelecidos por estudos de contractilidade *in vitro* de artérias pré-contraídas de ratos [85, 90, 95-97], de ratinhos [86], de coelhos [92], de porcos [98, 99], de porcos da índia [100], de furões [101], de cães [94] e na HUA [102]. Estes efeitos envolvem primeiramente o VSM sem necessitarem da presença do endotélio, embora a contribuição deste tenha sido reportada [85, 94].

Os mecanismos envolvidos na vasodilatação do VSM envolvem o NO, quando o endotélio está presente, e o bloqueamento do influxo de cálcio pelos canais de cálcio operados por voltagem [86, 103, 104] e do efluxo de potássio envolvendo os K_v [87, 95, 105] dos BKCa [90, 99] [102, 106], na sua ausência. Outro mecanismo proposto é a selectividade da testosterona para um receptor membranar [107]. Um estudo efectuado mostrou que a testosterona induz a vasodilatação na artéria coronária, mesentérica, ilíaca, renal e femoral [108], embora a sensibilidade varie entre artérias [92, 94, 108-110] e seja reduzida pelo envelhecimento [111].

O requerimento de elevadas concentrações de testosterona para ocorrer uma resposta vasodilatadora tem levantado algumas questões relativas à sua natureza fisiológica. Contudo, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm reportado efeitos vasodilatadores com baixas doses de testosterona [108] [112]. Um estudo realizado na linha celular A7r5 indica que a testosterona, a concentrações fisiológicas, pode inibir selectivamente a entrada de cálcio através dos LTCCs [112]. Paradoxalmente, para concentrações semelhantes de testosterona tenham sido observadas respostas vasoconstritoras [88, 89], incluindo um estudo em que a elevadas concentrações de testosterona era observada vasodilatação (revisão tabelas 2 e 3) [89].

O efeito relaxante do colesterol está ainda pouco estudado, tendo sido apenas reportado um estudo que refere uma redução nas correntes de cálcio e nos potenciais de acção dependentes de cálcio no músculo liso da vesícula biliar [113].

Tabela 1 – Tabela resumo de diferentes estudos realizados para analisar o efeitos da testosterona nos canais de potássio.

Espécie	Concentração de testosterona	Drogas	Efeito	Conclusão	Referência
Coelho	1-10 μ M	Controlo Glibenclamida (3 μ M) BaCl ₂ (3mM)	95% de relaxação \leftrightarrow \downarrow	Dilatação via activação dos K _{Ca} e/ou dos K _v	[92]
Cão <i>in vivo</i>	100nM-1 μ M	Controlo Glibenclamida (10 μ M)	86% de um pequeno \uparrow no CBF \downarrow resistência dos vasos	Dilatação via activação do K _{ATP}	[94]
Rato	9-300 μ M	Controlo TEA (1mM) Glibenclamida (3 μ M) 4-AP (1mM)	95% de relaxação \leftrightarrow $\downarrow\downarrow$ \leftrightarrow	Dilatação via activação K _{ATP}	[95]
Rato	5-300 μ M	Controlo TEA (1mM) Apamina (0,5 μ M) Glibenclamida (10 μ M) 4-AP (5nM)	100% de relaxação \leftrightarrow \leftrightarrow \leftrightarrow \downarrow	Dilatação via activação dos K _v	[87]
Rato	100pM- 10 μ M	Controlo	68% de relaxação	Dilatação via activação dos BKCa	[90]
Porco	5-75 μ M	Controlo TEA (2mM) IBTX (20nM)	97% de relaxação $\downarrow\downarrow\downarrow$ $\downarrow\downarrow\downarrow$	Dilatação via activação dos BKCa	[99]

\downarrow - eficácia de redução pequena; $\downarrow\downarrow$ - eficácia de redução média; $\downarrow\downarrow\downarrow$ - eficácia de redução elevada; \uparrow - eficácia de estimulação elevada; $\uparrow\uparrow$ - eficácia de estimulação média; $\uparrow\uparrow\uparrow$ - eficácia de estimulação elevada; \leftrightarrow - sem alteração;

Tabela 2 – Tabela resumo de diferentes estudos realizados para analisar o efeitos da testosterona nos canais de cálcio.

Espécie	Concentração de testosterona	Drogas	Efeito	Conclusões	Referências
Rato	7,5-120 μ M	Controlo Nifedipina (90nM)	100% de contracção ↓↓↓	Dilatação via inibição dos VOCCs	[97]
Porco	0,1- 100 μ M	Controlo	90% de relaxação	Dilatação via inibição VOCCs/ROCCs	[98]
Rato	0,1-100 μ M	Controlo	70% de relaxação	Dilatação via inibição VOCCs/ROCCs	[96]
Porco		Controlo Nifedipina (0,1 μ M)	100% de contracção + \uparrow [Ca ²⁺] ↓↓	Dilatação via inibição VOCCs/ROCCs	[93]
Rato	1-1000 μ M	Controlo	100% de relaxação	Dilatação via inibição ROCCs/VOCCs, com alguma actividade de PKC	[103]
Rato	1-1000 μ M	Controlo	30% de relaxação	Dilatação via inibição VOCCs/ROCCs, com alguma actividade da PKC	[91]

↓ - eficácia de redução pequena; ↓↓ - eficácia de redução média; ↓↓↓- eficácia de redução elevada; ↑ - eficácia de estimulação elevada; ↑↑ - eficácia de estimulação média; ↑↑↑ - eficácia de estimulação elevada; ↔ - sem alteração; CBF – Fluxo sanguíneo coronário.

Justificação e objectivos

Diversos são os estudos que indicam um risco de desenvolvimento de Doença Arterial Coronária e Hipertensão superior nos homens do que em mulheres pré-menopausa. Por volta dos 65 anos de idade, as mulheres apresentam o mesmo risco de sofrer de disfunções cardíacas como os homens da mesma idade. Este facto é visto como o resultado de efeitos desfavoráveis da hormona testosterona. Contudo, numerosos estudos clínicos e epidemiológicos apresentam resultados controversos na relação entre a testosterona e as doenças cardiovasculares. Por exemplo, baixos níveis de testosterona nos homens são positivamente correlacionados com inúmeros factores de risco na doença coronária. Evidências suportam também um efeito benéfico da testosterona no perfil lipídico e contra a formação aterosclerótica.

Para além da controvérsia relativamente aos efeitos benéficos da testosterona, o mecanismo pelo qual a testosterona induz relaxação é também ele controverso. Assim, propomo-nos analisar o mecanismo pelo qual a testosterona e o seu precursor biossintético o colesterol induzem relaxação nas células musculares vasculares de aorta de rato e de artéria umbilical humana.

A relativa incerteza que existe quanto ao efeito benéfico das hormonas sexuais na saúde cardiovascular tem estimulado os laboratórios a prosseguir no despertado interesse neste campo, de indiscutível importância nos tempos de hoje. O estudo electrofisiológico em células humanas está também pouco explorado, salientando-se a necessidade deste tipo de estudo.

Neste sentido, foram realizados estudos de *patch clamp* para analisar o efeito destes dois esteróides nos canais de cálcio tipo L e nos canais de potássio de células musculares lisas vasculares de aorta de rato. Por outro lado, o estudo de *patch clamp* de canais operados por nucleótidos cíclicos foi analisado com o intuito de averiguar se o mecanismo de relaxação induzido pela testosterona envolve a via de cGMP.

Materiais e métodos

1. Recolha de tecidos

A recolha dos segmentos de cordão umbilical foi realizada no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, com o consentimento informado das mães e de acordo com o Comité de Ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira. Os segmentos de cordão de partos eutócicos foram recolhidos com aproximadamente 5cm e dentro de intervalos não superiores a cinco minutos, tendo sido imediatamente colocados numa solução salina fisiológica com a seguinte composição (mM): 0,05 EDTA; 0,5 KCl; 1 HEPES; 0,2 MgCl₂; 1 NaHCO₃; 0,05 KH₂PO₄; 0,05 NaH₂PO₄; 1 glucose; 110 NaCl; 0,16 CaCl₂; com 10µL/mL de mistura de antibiótico e antimicótico (1U/mL penicilina, 0,1mg/mL de estreptomicina; anfotericina B 250 ng/mL)) e 0,1µL/mL de anti-proteases; pH 7,4. Foram refrigeradas a 4°C e utilizadas nas 24h seguintes.

2. Cultura de células

O isolamento das VSMCs da artéria umbilical foi realizado segundo o seguinte protocolo: primeiramente, artérias umbilicais foram isoladas a partir dos segmentos de cordão umbilical, após remoção da geleia de Warton circundante. De seguida, a artéria foi seccionada longitudinalmente e removida a camada endotelial da túnica interna por fricção com a cabeça de um cotonete estéril.

Após a remoção desta camada de células endoteliais, procedeu-se à extracção de segmentos longitudinais de túnica média. Todo o processo acima mencionado foi realizado num banho de gelo com os segmentos de cordas e artéria mergulhados na solução salina fisiológica anteriormente descrita, com a excepção de não conter anti-proteases. Os segmentos da túnica média, assim obtidos, foram colocados em frascos de cultura com área de 25cm³ (Nunc, Dinamarca), com um revestimento de colagénio realizado pelo menos trinta minutos antes de serem utilizados, e cultivadas com *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; Sigma-

Aldrich Química, Sintra, Portugal) suplementado com 1,2g/L de NaHCO_3 ; 0,02g/L de ácido L-ascórbico; 5% de soro bovino fetal desactivado; 0,5% (w/v) de albumina sérica bovina; 0,5% (v/v) de insulina; 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de factores de crescimento e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de mistura de antibiótico e antimicótico (1U/mL penicilina, 0,1mg/mL de estreptomicina; anfotericina B 250 ng/mL) e incubadas numa estufa a 37°C com uma atmosfera humidificada e saturada em 5% de CO_2 . O meio de cultura foi mudado a cada 2 a 3 dias até à confluência das culturas (15 a 20 dias). Subculturas destas células foram realizadas até à sexta passagem.

As VSMCs, procedentes de aorta de rato, da linha celular A7r5 (Promochem, Espanha) foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (Sigma-Aldrich Química, Sintra, Portugal) suplementado com 1,2g/L de NaHCO_3 ; 0,02g/L de ácido L-ascórbico; 20% de soro bovino fetal desactivado; 0,5% (w/v) de albumina sérica bovina; 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de mistura de antibiótico e antimicótico (1U/mL penicilina, 0,1mg/mL de estreptomicina; anfotericina B 250ng/mL). As células foram incubadas numa estufa a 37°C com uma atmosfera humidificada e saturada em 5% de CO_2 em frascos de cultura de 25mL.

Após atingirem a confluência, ambas as culturas foram mantidas em DMEM/F12 com a composição acima mencionada, sem soro bovino fetal desactivado, durante 24 a 48h. Passado esse tempo, as células foram tripsinizadas (tripsina 0,3%; Sigma-Aldrich Química, Sintra, Portugal) e estudadas num sistema de *patch clamp*.

3. Patch clamp. Princípios e configurações

A técnica de *patch clamp* é uma técnica electrofisiológica que permite o estudo de um ou múltiplos canais iónicos em células [114]. Esta técnica pode ser aplicada numa vasta gama de células, mas é especialmente vantajosa em células excitáveis como neurónios, cardiomiócitos, fibras musculares e células β pancreáticas. Erwin Neher e Bert Sakmann [115] desenvolveram esta técnica no final dos anos 70, início dos anos 80. Esta descoberta tornou possível, pela primeira vez, medir correntes num único canal, e examinar o seu envolvimento nos processos fundamentais da célula como a condução de potenciais de acção. Neher and Sakmann receberam o prémio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1991 [116] por este trabalho.

3.1. Princípios da técnica

Na técnica de *patch clamp* usa-se uma micropipeta de vidro, polida pelo calor e contendo um eléctrodo interno, que apresenta uma abertura de aproximadamente $1\mu\text{m}$. A micropipeta é pressionada contra uma parte da membrana da célula (*patch*) que contém um ou múltiplos canais iónicos.

A aplicação de uma pressão negativa, por sucção, no interior da micropipeta resulta na criação de um selo entre a superfície da célula e

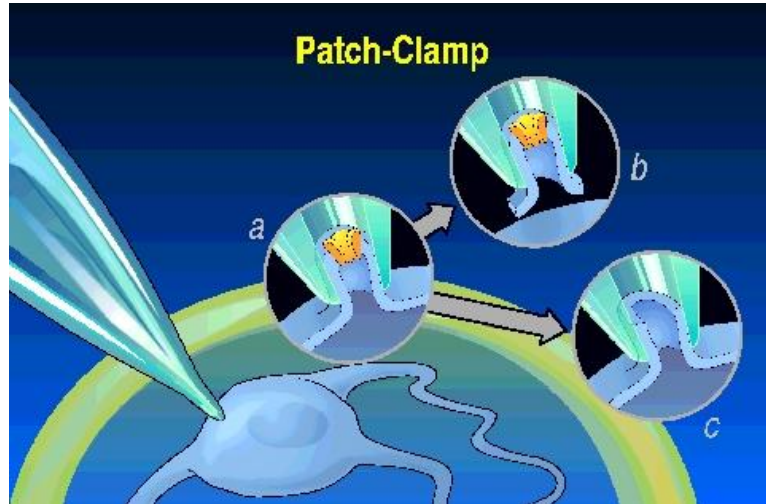


Figura 11 – Representação esquemática do selo entre a membrana plasmática e a micropipeta [4].

a superfície interna da micropipeta (figura 11). O interior da micropipeta contém uma solução interna com composição semelhante à solução que banha a célula, caso a configuração usada seja a *cell-attached*, ou ao citoplasma, para a configuração *whole-cell*. O fluxo de iões, através dos canais da membrana, pode ser assim medido como a diferença de potenciais entre os eléctrodos: o eléctrodo que se encontra no interior da micropipeta e o eléctrodo que se encontra na solução externa. Nesta técnica, o operador tem a hipótese de alterar as condições da solução interna e/ou externa, bem como adicionar drogas para estudar o seu efeito nos canais iónicos sob diferentes condições. Diversas variações básicas na técnica podem ser aplicadas dependendo do tipo de estudo [115].

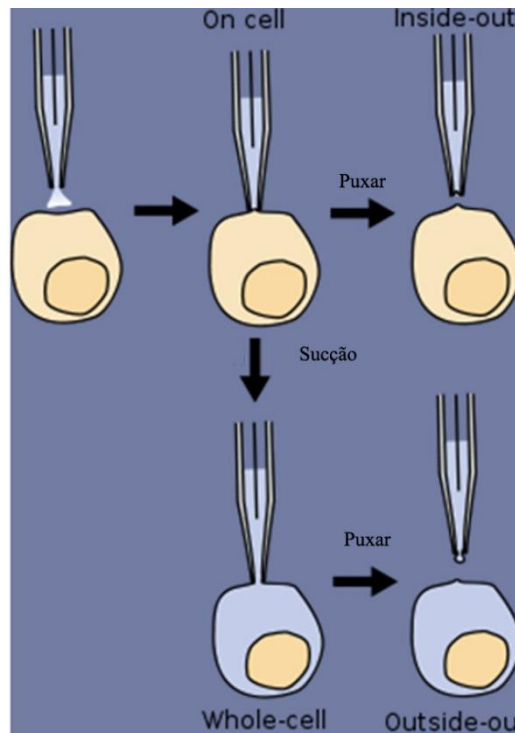


Figura 12 – Representação ilustrativa dos procedimentos que levam às diferentes configurações do *patch clamp* (adaptado de [117]).

3.2. *Whole-cell*

A configuração *whole-cell* envolve a leitura de correntes através de múltiplos canais, ao longo de toda a membrana plasmática. Depois de ser criado o selo, é exercida mais pressão de forma a quebrar a membrana e criando-se uma continuidade entre o interior da célula e a solução interna da micropipeta. Esta forma de configuração permite a existência de uma baixa resistência eléctrica, tornando possível o controlo da voltagem no interior da célula.

No decorrer de todo o trabalho, esta foi a configuração utilizada.

4. Protocolos e técnicas usadas nas A7r5

4.1. Medição dos canais de potássio e dos canais de cálcio tipo L

A técnica de *patch clamp*, na configuração *whole-cell*, foi usada para analisar as correntes de cálcio tipo L ($I_{Ca,L}$) e de potássio (I_K). Para analisar as $I_{Ca,L}$, foi usada uma solução externa com a composição (mM): 124,0 NaCl; 5,0 $CaCl_2$; 5,0 HEPES; 10,0 TEA; 4,7 KCl e 6,0 glucose; pH 7,4 ajustado com NaOH. Como meio interno, colocado no interior da micropipeta de vidro, utilizou-se uma solução com a seguinte composição (mM): 119,8 CsCl; 0,06 $CaCl_2$; 4,0 $MgCl_2$; 3,1 Na-ATP; 0,4 Na-GTP; 5,0 EGTA; 10,0 HEPES e 10,0 TEA; pH 7,3 ajustado com CsOH.

Na preparação das soluções acima supracitadas usou-se cério em vez de potássio e TEA, uma vez que estes permitem bloquear as correntes de potássio. As células foram mantidas a um potencial de repouso de -80mV e despolarizadas a cada 8s para 0mV durante 500ms para se medir a $I_{Ca,L}$ (figura 13). Os valores de $I_{Ca,L}$ foram registados na presença de colesterol, testosterona e com ou sem estimulação por BAY K8644.

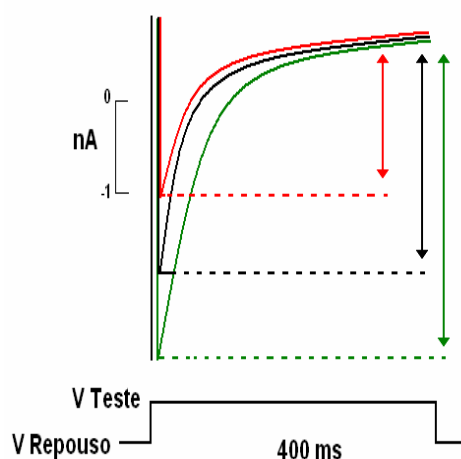


Figura 13 – Curvas típicas de corrente de cálcio.

Para se analisar as correntes de potássio (I_K), a solução externa controlo com a composição (mM): 134,3 NaCl; 1,0 $CaCl_2$; 5,0 HEPES; 5,4 KCl e 6,0 glucose; pH 7,4 ajustado com NaOH e como meio interno, colocado no interior da micropipeta de vidro,

uma solução com a seguinte composição: 125,0 KCl; 1,0 MgCl₂; 5,0 Na-ATP; 0,5 Na-GTP; 0,1 EGTA; 20,0 HEPES e 10,0 glucose; pH 7.3 ajustado com KOH.

Para a análise de I_K foi usado o potencial de repouso de -80mV e as despolarizações realizadas a cada 8s para o potencial de 60mV durante 300ms. Com este procedimento foi possível registar-se o efeito do colesterol e da testosterona nas correntes de potássio, bem como o efeito de diferentes inibidores de canais de potássio.

As correntes basais de I_{Ca}, e de I_K foram medidas 3 a 5 minutos após a quebra da membrana da célula, de forma a permitir a estabilização e equilíbrio entre a micropipeta e o meio intracelular. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (21-25°C).

Estas medições foram adquiridas por um amplificador Axonpatch 200B (Axon instruments, USA), filtradas a 0,1kHz e registadas a uma velocidade de 10kHz usando a interface analógica Digidata 1322A (Axon Instruments, USA), conectada com um computador compatível com o software Pclamp8 (Axon Instruments, USA). A solução externa é aplicada na proximidade da célula através de um capilar com um diâmetro de 250µm e um fluxo de 20µL/min. A análise dos dados foi feita através do programa Clampfit versão 8.1.0.12 (Axon Instruments, USA).

5. *Protocolos e técnicas usadas nas células musculares lisas da artéria umbilical*

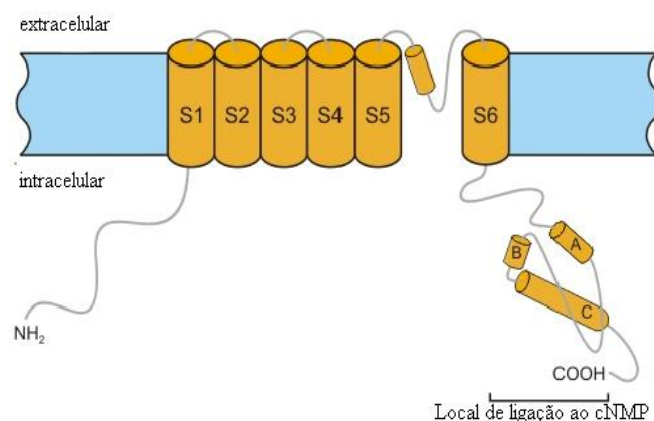
5.1. *Canais activados por nucleótidos cíclicos (CNG)*

Os CNG foram primeiramente identificados nos fotoreceptores da retina e no neurónio sensitivo olfativo (OSN) [118, 119]. Os CNGs apresentam uma homologia estrutural com os canais catiónicos dependentes de voltagem ([120] citados por [121]). Os canais nativos são complexos heteroméricos, consistindo em diferentes subunidades designadas como α e β , baseado na sua capacidade de formar ou não um canal funcional [122]. Estas subunidades apresentam seis segmentos transmembranares (S1-S6), um

segmento sensível à voltagem, o segmento S4, e um domínio ligador de nucleótidos cíclicos (figura 14)[122].

Os CNG são canais não selectivos a catiões em geral, que abrem em resposta a nucleótidos cíclicos e a sua activação é independente do Em. Estes canais são selectivos a catiões específicos relativamente a aniões, mas são pouco discriminativos em relação a catiões mono ou divalentes [123].

Anteriormente reconhecidos como geradores de correntes através de influxo de sódio pela indução do ligando cAMP ou cGMP, sabe-se agora que os CNGs são mais permeáveis ao cálcio do que ao sódio [122].



A sua elevada selectividade para o cálcio pode indicar o papel essencial destes canais na entrada de cálcio [121].

Após a ligação do nucleótide cíclico, o canal torna-se bastante permeável ao sódio e ao potássio. Esta actividade é facilmente detectada usando o *patch clamp* [124, 125]. A subunidade α wild-type (WT) olfatória de rato (CNG2) é um biosensor importante para o cGMP [126].

Os canais CNG apresentam muitas características que os tornam adequados como biossensores. Estes apresentam uma activação rápida, não são dessensibilizados, apresentam pouca sensibilidade para alterações de potencial e podem ser usados em diversos tipos de células [127]. Estas características tornam estes canais ideais para medir o cGMP junto da membrana.

5.2. Infecção das VSMCs da artéria umbilical humana com CNG2 WT cGMP

Uma vez as células isoladas e em confluência próxima de 100% , o meio foi substituído por DMEM/F12, com a composição referida em anteriormente, mas sem soro fetal bovino e antibiótico, tendo sido mantidas entre 1-2h. Passado esse período, o meio de cultura foi substituído por meio fresco, contendo $2,5 \times 10^5$ partículas virais por μL . Este adenovírus continha a subunidade α *wil-type* olfatória de rato (CNG2), e mantidas durante 24h no incubador a 37°C. Sendo colocadas no meio de cultura mencionado em 6.2, durante 12h, numa estufa a 37°C com uma atmosfera humidificada e saturada em 5% de CO_2 .

5.3. Medição das correntes de CNG

Para estudar as correntes de CNG (I_{CNG}), a solução externa controlo com a composição (mM): 107,0 NaCl; 10,0 HEPES; 20,0 CsCl e 5,0 glucose; pH 7.4 foi utilizada, e como meio interno, colocado no interior da micropipeta de vidro, uma solução com a seguinte composição (mM): 113,8 CsCl; 0,06 CaCl_2 ; 2,5 MgCl_2 ; 3,1 Na-ATP; 0,4 Na-GTP; 20,0 EGTA; 20,0 HEPES e 5,0 glucose; pH 7.3 ajustado com CsOH.

Para a análise de I_{CNG} foi usado o potencial de repouso de -50mV e as despolarizações realizadas a cada 9s para o potencial de 0mV durante 200ms. Desta forma registou-se o efeito da testosterona nas correntes de CNG.

As correntes basais de CNG foram medidas 3 a 5 minutos após a quebra da membrana da célula, de forma a permitir a estabilização e equilíbrio entre a micropipeta e o meio intracelular. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (21-25°C).

Estas medições foram adquiridas por um amplificador Axonpatch 200B (Axon instruments, USA), filtradas a 0,1kHz e registadas a uma velocidade de 10kHz usando a interface analógica Digidata 1322A (Axon Instruments, USA), conectada com um computador compatível com o software Pclamp8 (Axon Instruments, USA). A solução externa é aplicada na proximidade da célula através de um capilar com um diâmetro de

250 μ m com um fluxo de 20 μ L/min. A análise dos dados foi feita através do programa Clampfit versão 8.1.0.12 (Axon Instruments, USA).

6. *Fármacos*

Todos os fármacos e químicos adquiridos na Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal), excepto a 4-aminopiridina, fornecida pela Biogen Científica (Madrid, Espanha). Todas as diluições dos fármacos foram preparadas diariamente, imediatamente antes da sua utilização, a partir de soluções concentradas, armazenadas a -20°C e preparadas da seguinte forma: a flutamina, o BAY K8644 K, a nifedipina, o colesterol e a testosterona foram inicialmente dissolvidas em etanol absoluto. A 4-AP, a glibenclamida, a apamina e a TEA eram inicialmente dissolvidas em água desionizada. As diluições a utilizar foram feitas na solução electrofisiológica externa.

7. *Apresentação dos dados e tratamento estatístico*

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado no sistema de análise estatística SigmaStat, versão 3.5, sendo expresso como uma média \pm o erro estatístico da média associado.

A máxima amplitude de $I_{Ca,L}$ foi calculada como a diferença entre o pico máximo de corrente e a corrente *plateau* no final de cada pulso de 8s (figura 13). As variações nas $I_{Ca,L}$ induzidas pelos diferentes fármacos usados foram expressas como percentagem em relação ao basal ou em relação a $I_{Ca,L}$ estimuladas por BAY K8644. As variações nas I_K foram expressas como percentagem em relação às correntes de potássio obtidas por despolarização na ausência de qualquer droga.

Resultados

1. Efeito da testosterona e colesterol na $I_{Ca,L}$ nas A7r5

A técnica de *patch clamp whole-cell* foi utilizada para analisar os efeitos do colesterol e da testosterona nas correntes de cálcio através dos LTCC ($I_{Ca,L}$) em células A7r5, uma vez que um dos mecanismos de relaxação propostos para a testosterona é a inibição do LTCCs [112]. O valor médio da densidade basal de $I_{Ca,L}$ determinado foi de $0,93 \pm 0,05 \text{ pA/pF}$ ($n=34$). Como pode ser observado no gráfico 1, o colesterol e a testosterona no ambiente extracelular levaram a uma diminuição nas $I_{Ca,L}$. Esta inibição de $I_{Ca,L}$ foi reversível e directamente proporcional ao aumento da concentração de colesterol e testosterona.

Concentrações mais elevadas de testosterona ($30 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$) alcançaram uma redução de $I_{Ca,L}$ basal superiores, entre 25% e 30%, relativamente às mesmas concentrações de colesterol. As restantes concentrações testadas apresentaram reduções semelhantes na $I_{Ca,L}$ entre o colesterol e a testosterona.

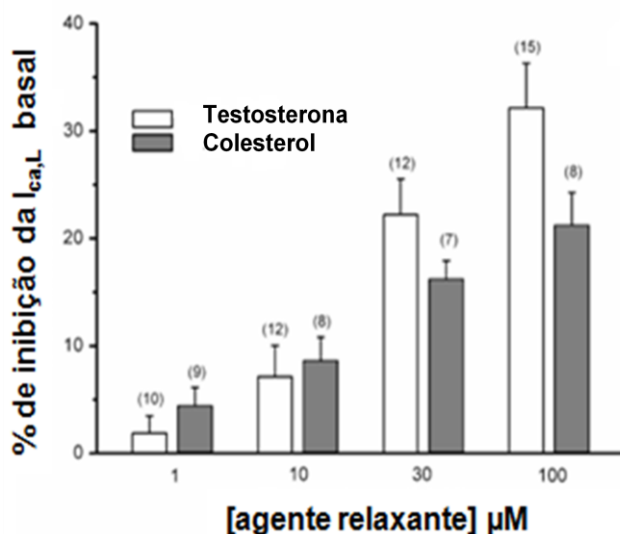


Gráfico 1 – Efeito do colesterol e da testosterona nas $I_{Ca,L}$ basais em células A7r5. Cada coluna representa o valor médio \pm E.E.M.

Para melhor se caracterizarem os efeitos inibidores da testosterona e do colesterol nos LTCCs foi analisado o seu efeito após se estimular as $I_{Ca,L}$ com um agonista dos LTCCs, o BAY K8644 (10 nM). O BAY K8644 apresentou uma estimulação das correntes $I_{Ca,L}$ de $74,8 \pm 5,7\%$ ($n=36$). No gráfico 2 mostra-se o efeito inibitório da

testosterona e do colesterol nas células pré-estimuladas com BAY K8644. A testosterona inibiu reversivelmente a $I_{Ca,L}$ estimulada por BAY K8644, sendo este efeito inibitório dependente da concentração usada.

A concentração mais elevada de testosterona utilizada (100 μ M) inibiu por completo a estimulação por BAY K8644, abaixo do nível da $I_{Ca,L}$ basal (gráfico 2). No entanto, a mesma concentração de colesterol (100 μ M) inibiu a $I_{Ca,L}$ em $73.9 \pm 16.8\%$ (gráfico 2). Apesar do efeito do colesterol ser inferior em termos de percentagem, o efeito da testosterona e do colesterol nas $I_{Ca,L}$ pré-estimuladas com BAY K8644 não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$, Teste t -Student).

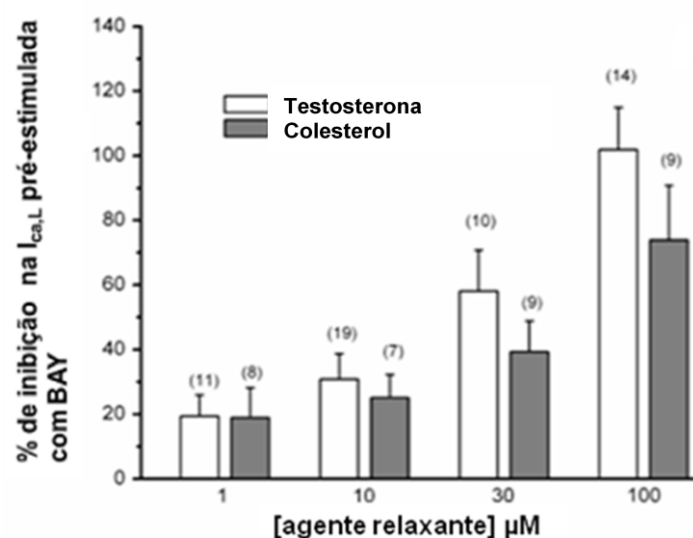


Gráfico 2 – Efeito do colesterol e da testosterona nas $I_{Ca,L}$ basais em células A7r5 pré-estimuladas com BAY K8644 . Cada coluna representa o valor médio \pm E.E.M.

2. Efeito da testosterona e colesterol na I_K nas A7r5

O valor médio da densidade basal de I_K determinado foi de $9,1 \pm 1,4$ pA/pF ($n=34$). Para se determinar que tipo de canais de potássio estão presentes nas A7r5, foram usados inibidores selectivos de diferentes canais. Assim, foi usado o inibidor de K_V 4-AP (2mM), tendo-se observado uma redução nas correntes de potássio (I_K) de $35.8 \pm 2.9\%$ ($n=6$) a 60mV. Usou-se a TEA (1mM), que é usada como inibidora dos BKCa, e que produziu uma inibição na corrente de $30.4 \pm 5.7\%$ ($n=6$) a 60mV. Foram também usados

os inibidores apamina (10 μ M) para verificar a presença de canais de potássio activados por cálcio de baixa voltagem, que teve uma pequena redução na I_K basal ($9.8\pm 2.5\%$, $n=7$), e a glibenclamida (10 μ M), usualmente usada como inibidor para os K_{ATP} , que também apresentou uma fraca capacidade redução de correntes de potássio ($8.7\pm 0.8\%$, $n=5$) (gráfico 3). Os efeitos destes inibidores foram totalmente reversíveis após lavagem do fármaco.

De acordo com os resultados obtidos, a corrente de potássio neste tipo de células parece ser maioritariamente constituída por canais de potássio K_V e $BKCa$.

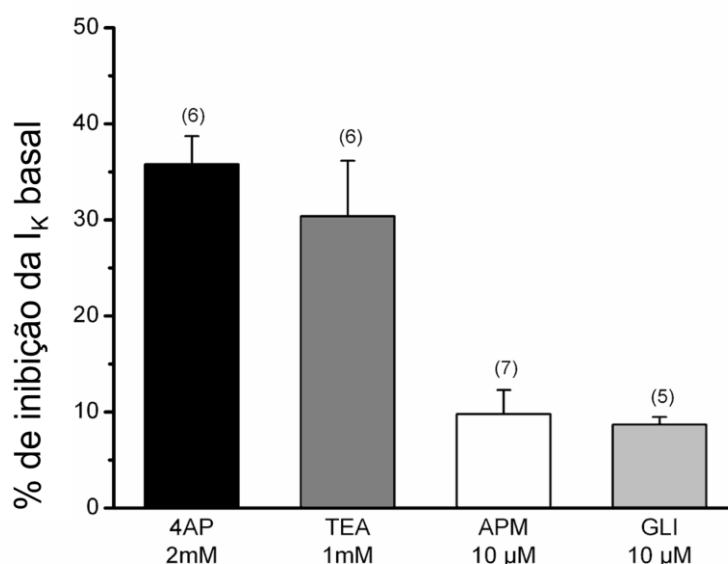


Gráfico 3 – Efeito de diferentes inibidores de canais de potássio na I_K basal nas células A7r5. Cada coluna representa o valor médio \pm E.E.M em percentagem de inibição de I_K . O inibidor de K_V : 4-aminopiridina (4-AP); o inibidor de $BKCa$: tetraetilamónio (TEA); o inibidor apamina (APM) dos canais de potássio activados por cálcio de baixa voltagem; glibenclamida (Gli): inibidor dos K_{ATP} .

Para melhor se caracterizar o efeito vasodilatador da testosterona e do colesterol, foram analisados os efeitos destes esteróides na I_K . Os resultados demonstraram que as diferentes concentrações usadas (1 μ M, 10 μ M, 30 μ M e 100 μ M) tanto de testosterona como de colesterol não afectam a I_K (tabela 4), sugerindo que o efeito relaxante da testosterona parece não se dever aos canais de potássio.

Tabela 3 – Efeito do colesterol e da testosterona na I_K basal nas A7r5. Estes valores representam a percentagem de variação da I_K basal \pm EEM.

Concentração	Testosterona	Colesterol
1 μ M	1.5 \pm 1.9% (n =10)	-1.8 \pm 1.9% (n =10)
10 μ M	-0.8 \pm 2.3% (n =7)	-1.3 \pm 1.6% (n =10)
30 μ M	-1.0 \pm 1.7% (n =9)	-0.0 \pm 0.9% (n =10)
100 μ M	-6.8 \pm 3.3% (n =9)	1.4 \pm 0.8% (n =8)

3. *Efeito da testosterona nos I_{CNG} nas células musculares lisas da artéria umbilical humana*

As correntes dos canais de CNG (I_{CNG}) foram medidas por *patch clamp whole-cell*. As células usadas neste procedimento foram previamente infectadas com adenovírus WT CNG2. O WT CNG2 é sensível ao cGMP, sendo usado como um sensor para o mesmo. Esta metodologia foi usada para medir as alterações induzidas pela testosterona nos níveis de cGMP, em tempo real, adjacentes à membrana plasmática.

A testosterona activou as correntes I_{CNG} de uma forma dependente da concentração (tabela 4). A concentração mais elevada de testosterona (100 μ M) mostrou activar as I_{CNG} na ordem dos 100 \pm 3,03% (n=6). As concentrações inferiores de testosterona de 10 μ M e 1 μ M também foram capazes de estimular as correntes de CNG com valores de estimulação das I_{CNG} de 88,7 \pm 5,29% (n =3) e 62,2 \pm 22,66% (n =3), respectivamente.

Tabela 4 – Efeito da testosterona na I_{CNG} basal nas células musculares lisas da artéria umbilical. Estes valores representam a percentagem de variação da I_{CNG} basal \pm EEM.

Concentração	Testosterona
1 μ M	62,2 \pm 22,66% (n =3)
10 μ M	88,7 \pm 5,29% (n =3)
100 μ M	106,7 \pm 3,03% (n =6)

Discussão dos resultados

Para analisar o mecanismo vasodilatador da testosterona nos LTCCs e nos canais de potássio, foram realizados estudos de *patch clamp* na linha de células musculares lisas de aorta torácica de rato, A7r5. Para tal, foram usados agonistas e inibidores específicos para os diferentes canais. O BAY K8644, um agonista dos LTCCs, estimulou claramente as $I_{Ca,L}$, e a nifedipina, um antagonista selectivo, bloqueou significativamente tanto as correntes basais como as correntes estimuladas por BAY K8644. Estes dados sugerem que a corrente analisada se deve aos LTCCs. No estudo, também foram usados inibidores selectivos de canais de potássio. Os inibidores dos canais K_v e BKCa reduziram a I_K basal em 35% e 30%, respectivamente. Por outro lado, os inibidores dos canais SKCa e K_{ATP} não afectaram a I_K basal. Assim, a I_K analisada deve-se, na sua maioria, a dois tipos de canais: os BKCa e os K_v .

Após se verificar o tipo de canais presentes, foi analisado o efeito de diferentes concentrações (1 μ M, 10 μ M, 30 μ M e 100 μ M) de testosterona e de colesterol. Pelos resultados obtidos demonstrou-se que estes esteróides têm um efeito vasodilatador nas células A7r5. Este efeito vasodilatador envolve a inibição dos canais de cálcio tipo L. Esta vasorelaxação foi dependente da concentração do esteróide utilizada. Pôde também observar-se que o efeito vasodilatador da testosterona (100 μ M) foi superior ao da mesma concentração de colesterol (gráfico 1 e 2). Estes dados indicam que a testosterona e o colesterol modulam a homeostase do cálcio nas VSMCs da aorta de rato, pela inibição do influxo de cálcio através dos canais dependentes de voltagem, os LTCCs. No que respeita às I_K , estes esteróides não apresentaram qualquer efeito (tabela 4). Estes resultados vão de acordo com os estudos realizados no mesmo tipo de células por Hall et al. [112] e Scragg et al. [107], sugerindo que a testosterona inibe os LTCCs a baixas concentrações [104, 112] e os canais de cálcio tipo T em concentrações mais elevadas.

Os resultados também demonstram que a testosterona inibe a $I_{Ca,L}$ estimulada por BAY K8644, comprovando a inibição dos LTCCs pela testosterona e pelo colesterol, na aorta de rato. Tal como outros estudos demonstraram [128], este efeito foi rápido e reversível, uma vez que desapareceu após lavagem do fármaco. Por estes motivos, pode deste modo corroborar-se as conclusões de diversos autores, que têm sugerido que o efeito vasorelaxante agudo da testosterona é mediado através de mecanismos não genómicos.

Diversos são os mecanismos para justificar o efeito vasorelaxante da testosterona, sendo os mais referidos a activação dos canais de potássio e o bloqueio dos canais de cálcio.

Yue *et al.*, em 1995 [92] sugeriram a activação dos canais K_V e $BKCa$ na relaxação da artéria coronária e aorta torácica de rato. Em contraste, dois estudos subsequentes demonstraram a contribuição dos K_{ATP} , na artéria coronária de cão [94] e na aorta torácica de rato normais e hipertensivos [95] (1995). Contudo, nos ratos hipertensivos a resposta à testosterona foi reduzida pela glibenclamida, assim como por bloqueadores dos K_V (4-AP) e K_{Ca} (TEA). Ding e Stallone [87], 2001, sugeriram que o efeito da testosterona era mediado pela activação dos K_V na aorta torácica de rato, utilizando uma metodologia similar a Honda *et al.* [95], 1999. Estudos posteriores em artérias coronárias de porco [99], em rede vascular mesentérica de ratos [90], em aorta de rato [129], em artéria coronária de rato [130], artéria mamária interna humana [131], artéria radial humana [132] e na artéria umbilical humana [102] demonstraram também um papel dos canais de potássio no efeito vasodilatador da testosterona.

Em estudos com artérias humanas existe também esta discrepância. No entanto, este facto pode dever-se aos diferentes tipos de artérias usadas, bem como à metodologia aplicada em cada estudo em particular.

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram a presença de $BKCa$ e K_V neste tipo de células. No entanto, estes canais parecem não estar envolvidos no efeito vasodilatador da testosterona na aorta de rato. Tais observações corroboram a controvérsia existente acerca do efeito vasodilatador da testosterona nos diferentes canais de potássio. A activação destes canais no VSM pode induzir a repolarização e o fecho dos LTCCs, contribuindo deste modo para a relaxação.

Estudos já efectuados para verificar a acção da testosterona referem tanto a activação dos VOCCs como dos ROCCs. O primeiro estudo a propor uma acção antagonista da testosterona nos canais de cálcio foi realizado por Perusquía e Villalón em 1999 [97], em artérias de rato. Foi sugerida uma inibição tanto dos ROCCs como dos VOCCs, mas com um efeito superior nos VOCCs [97]. Estudos subsequentes por Crews e Khalil em artérias coronárias de porco [98] e artérias aórticas torácicas de rato [96] e por Murphy e Khalil, 1999 [93], em artérias coronárias de porco, obtiveram resultados semelhantes, sugerindo também a inactivação dos VOCCs e dos ROCCs. Estudos posteriores implicam a inactivação dos LTCCs [107, 112, 133, 134] e activação da PKC [91, 103].

Para além destes mecanismos, a existência de um receptor ainda não identificado localizado na membrana, no espaço intracelular ou uma ligação directa da testosterona ao LTCC foram também sugeridos [105, 107, 135, 136]. Um outro mecanismo sugerido é a existência de uma interacção entre a testosterona e a via dos nucleótidos cíclicos [99]. Este advém do estudo de Deenadayalu et al., 2001,[99], no qual observou um aumento dos nucleótidos cíclicos associados ao efeito vasodilatador da testosterona nos miócitos coronários de porco.

Para além da testosterona, outras hormonas esteróides apresentam o mesmo efeito vasodilatador [98, 137, 138]. Os mecanismos propostos são semelhantes, como a inibição da entrada de cálcio [98] ou inibição dos LTCCs por estrogénios [139]. Estes dados sugerem um efeito inespecífico deste grupo de esteróides.

De facto, o farnesol, um intermediário na síntese do colesterol, foi descrito como sendo um inibidor dos LTCCs em VSMCs [140] e indutor da relaxação na aorta de rato e em artérias mesentéricas humanas [141]. Por este motivo, foi também analisado neste estudo o efeito do colesterol. Como pode observar-se, este esteróide apresenta efeitos semelhantes à testosterona inibindo a $I_{Ca,L}$ estimulada por BAY K8644 e basal. Tal como a testosterona, não apresentou efeitos nas correntes dos canais de potássio. Estes dados sugerem que estes dois esteróides partilham um mesmo mecanismo de acção na aorta de rato, estando nele envolvido a inactivação dos canais de cálcio, LTCCs.

Para avaliar o efeito da testosterona na via dos nucleótidos cíclicos, mais precisamente o cGMP, estudos de *patch clamp* em VSMCs da artéria umbilical foram realizados para analisar as correntes de CNG (I_{CNG}). Estudos posteriores demonstraram o aumento do cAMP e/ou do cGMP, nas VSMC da artéria umbilical, induzido pela testosterona. Foi também observada a inibição da PKG, uma enzima activada pelo cGMP, impedindo o efeito vasodilatador da testosterona [142].

Os resultados obtidos demonstraram que a testosterona em diferentes concentrações (1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) estimula, de forma dependente da concentração, as correntes de CNG, sendo este um efeito reversível após lavagem da droga.

Estes dados vão de acordo com a observação de Deenadayalu et al [99], que verificaram um aumento do cGMP na artéria coronária de porco após uma exposição de 30 minutos a diferentes concentrações de testosterona, sendo que observaram também a activação

de BKCa por análogos do cGMP. Estes dados sugerem uma associação entre o efeito vasodilatador da testosterona e a via dos nucleótidos cíclicos.

Conclusões

No presente estudo foi demonstrado que a testosterona e o colesterol são capazes de inibir as correntes de cálcio do tipo L, basal ou estimulada por BAY K8644 (10nM), em células A7r5.

Pelos resultados obtidos, pode concluir-se que esta inibição é dependente da concentração e reversível, sendo que a testosterona apresenta uma potência de inibição superior à do colesterol. Deste modo, podemos sugerir que a inibição dos canais de cálcio tipo L é um dos mecanismos responsáveis pela indução de relaxação pela testosterona e colesterol na aorta de rato.

Nas células musculares lisas vasculares da artéria umbilical, os dados demonstraram que a testosterona é capaz de activar as correntes de CNG. Esta activação é dependente da concentração de testosterona utilizada, tendo sido obtida uma estimulação na ordem dos 100% para a concentração mais elevada de testosterona (100µM). De acordo com os resultados, pode sugerir-se que a acção vasodilatadora da testosterona produz um aumento do cGMP intracelular, demonstrando uma associação entre o efeito vasodilatador da testosterona e a via do nucleótido cíclico cGMP.

Assim, pelos resultados obtidos neste trabalho, torna-se evidente a necessidade de analisar as correntes de CNG, por estudos electrofisiológicos de *patch clamp*, nas células A7r5. Estes estudos permitiram verificar se o mesmo efeito da testosterona é observado nestas células. Estes dados permitiram ainda fazer um estudo comparativo entre as células musculares lisas da aorta de rato e as células musculares lisas da artéria umbilical humana.

Bibliografia

1. *Circulatory and Respiratory Systems*. 2009 [cited 27-06-2009]; Available from: <http://cas.bellarmino.edu/tietjen/images/artery-vein.gif>.
2. Hill, M. *Placenta Development*. 2009 16-06-2009 [cited 18-06]; Available from: <http://embryology.med.unsw.edu.au/notes/Placenta.htm>.
3. (ISB), I.o.S.B.a.B. *Ion Channels*. 2009 [cited 17-06; Available from: http://www.fz-juelich.de/isb/isb-1/ion_channels.
4. IPMC. *How do we study the brain ?* 2009 [cited 23-06]; Available from: <http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/neurophysiology/patch.htm>.
5. Park, W.S., et al., *Activation of inward rectifier K⁺ channels by hypoxia in rabbit coronary arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(6): p. H2461-2467.
6. Park, W.S., et al., *Direct modulation of Ca²⁺-activated K⁺ current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells*. Vascular Pharmacology, 2007. **46**(2): p. 105-113.
7. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
8. Park, W.S., et al., *The protein kinase C inhibitor, bisindolylmaleimide (I), inhibits voltage-dependent K⁺ channels in coronary arterial smooth muscle cells*. Life Sci, 2005. **77**(5): p. 512-27.
9. Park, W.S., et al., *Endothelin-1 acts via protein kinase C to block KATP channels in rabbit coronary and pulmonary arterial smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **45**(2): p. 99-108.
10. Khalil, R.A., *Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension*. Hypertension, 2005. **46**(2): p. 249-54.
11. Carey, M.A., et al., *The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(2): p. L272-278.
12. Messerli, F.H., et al., *Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension*. Ann Intern Med, 1987. **107**(2): p. 158-61.
13. English, K.M., et al., *Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms*. Eur Heart J, 2000. **21**(11): p. 890-4.
14. Alexandersen, P., et al., *Natural Androgens Inhibit Male Atherosclerosis : A Study in Castrated, Cholesterol-Fed Rabbits*. Circ Res, 1999. **84**(7): p. 813-819.
15. Rosano, G.M., et al., *Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease*. Circulation, 1999. **99**(13): p. 1666-70.
16. Berne, R.M. and Levy, M.N., *Physiology*. 4 ed. 1998, Missouri: Mosby, Inc. 300-316.
17. Seeley, R.R., Stephens, T.D., and Tate, P., *Anatomia & Fisiologia*. 1^a ed. 2001, Lisboa: LUSODIDACTA. 317-320.
18. Guyton, A.C. and Hall, J.E., *Textbook of medical physiology*. 11^a ed. 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. 92-99.
19. Wang, R., Li, Q., and Tang, D.D., *Role of vimentin in smooth muscle force development*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(3): p. C483-9.

20. Johansson, B., et al., *Intermediate filament proteins in adult human arteries*. Anat Rec, 1997. **247**(4): p. 439-48.
21. Rice, R.V., et al., *The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle*. J Cell Biol, 1970. **47**(1): p. 183-96.
22. Pocock, G. and Richards, C.D., *Human Physiology: The basis of medicine*. 1999, New York: Oxford University Press. 99-102.
23. Vander, A., Sherman, J., and Luciano, D., *Human Physiology: The mechanisms of body function*. 8^a ed. 2001, New York: McGraw-Hill Higher Education. 324-331.
24. Bernirschke, K. and Kaufman, P., *Pathology of the human placenta*. 4^a ed. 2000, New York: Springer-Verlag. 335-388.
25. Somlyo, A.P. and Himpens, B., *Cell calcium and its regulation in smooth muscle*. FASEB J., 1989. **3**(11): p. 2266-2276.
26. Karaki, H., et al., *Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(2): p. 157-230.
27. Jaggar, J.H., et al., *Calcium sparks in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(2): p. C235-256.
28. Navedo, M.F., et al., *Constitutively active L-type Ca²⁺ channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(31): p. 11112-11117.
29. Dixon, B.S., et al., *Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 1): p. C1406-20.
30. Lee, M.W. and Severson, D.L., *Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. C659-78.
31. Murphy, R.A., *What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation*. Faseb J, 1994. **8**(3): p. 311-8.
32. Hai, C.M. and Murphy, R.A., *Ca²⁺, crossbridge phosphorylation, and contraction*. Annual Reviews of Physiology, 1989. **51**: p. 285-98.
33. Standen, N.B. and Quayle, J.M., *K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle*. Acta Physiol Scand, 1998. **164**(4): p. 549-57.
34. Crozatier, B., *Central role of PKCs in vascular smooth muscle cell ion channel regulation*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(6): p. 952-5.
35. Minami, K., et al., *Protein kinase c-independent inhibition of the Ca²⁺-activated K⁺ channel by angiotensin II and endothelin-1*. Biochemical Pharmacology, 1995. **49**(8): p. 1051-1056.
36. Park, W.S., et al., *Angiotensin II inhibits inward rectifier K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase Calpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(3): p. 728-35.
37. Dessy, C., et al., *Evidence for involvement of the PKC-alpha isoform in myogenic contractions of the coronary microcirculation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(3): p. H916-23.
38. Quayle, J.M., Nelson, M.T., and Standen, vN.B., *ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle*. Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 1165-232.

39. Robertson, B.E., et al., *cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 1): p. C299-303.
40. Kubo, M., et al., *Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(3): p. 471-6.
41. Nelson, M.T. and Quayle, J.M., *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
42. Marín, J., et al., *Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps*. Life Sciences, 1998. **64**(5): p. 279-303.
43. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P., *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 552-65.
44. Ibrahim, B., et al., *Membrane potential of smooth muscle cells of human allantochoial placental vessels*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1996. **39**(2): p. 203-208.
45. Casteels, R., Droogmans, G., and Hendrickx, H., *Membrane potential of smooth muscle cells in K-free solution*. The Journal of Physiology, 1971. **217**(2): p. 281-295.
46. Cox, R.H., *Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle*. Cell Biochem Biophys, 2005. **42**(2): p. 167-95.
47. Cribbs, L.L., *T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 221-30.
48. Hockerman, G.H., et al., *Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 361-96.
49. Xiong, Z. and Sperelakis, N., *Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 75-91.
50. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009. **45**(3-4): p. 175-84.
51. Loirand, G., et al., *Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein*. J Physiol, 1991. **437**: p. 461-75.
52. Raingo, J., et al., *Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries*. Placenta, 2004. **25**(8-9): p. 723-9.
53. Striessnig, J., et al., *L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(4): p. 1341-6.
54. Amberg, G.C., et al., *A-type potassium currents in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(3): p. C583-595.
55. Milesi, V., et al., *Potassium Channels in Human Umbilical Artery Cells*. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 2003. **10**(6): p. 339-346.
56. Jiang, Y., et al., *X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 33-41.
57. Judge, S.I.V. and Bever, J.C.T., *Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment*. Pharmacology & Therapeutics, 2006. **111**(1): p. 224-259.
58. Ledoux, J., et al., *Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone*. Physiology, 2006. **21**(1): p. 69-78.

59. Cui, J., Yang, H., and Lee, U.S., *Molecular mechanisms of BK channel activation*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 852-75.
60. Weiger, T., Hermann, A., and Levitan, I., *Modulation of calcium-activated potassium channels*. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 2002. **188**(2): p. 79-87.
61. Noma, A., *ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle*. Nature, 1983. **305**(5930): p. 147-8.
62. Nelson, M.T., et al., *Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels*. Nature, 1990. **344**(6268): p. 770-3.
63. Nakashima, M. and Vanhoutte, P.M., *Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **272**(1): p. 379-84.
64. Teramoto, N., *Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 3): p. 617-24.
65. Quayle, J.M., et al., *Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 1): p. C1112-8.
66. Park, W.S., et al., *Increased inhibition of inward rectifier K⁺ channels by angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1768-75.
67. Rivers, R.J., et al., *Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles*. Circulation, 2001. **104**(15): p. 1749-53.
68. Quayle, J.M., et al., *Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. C1363-70.
69. Robertson, B.E., Bonev, A.D., and Nelson, M.T., *Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 2): p. H696-705.
70. Payne, A.H. and Hales, D.B., *Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 947-970.
71. Wikipedia. *Androgen*. 2009 [cited 29-06; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Androgens>.
72. Venken, K., et al., *Sex hormones, their receptors and bone health*. Osteoporos Int, 2008. **19**(11): p. 1517-25.
73. Juul, A. and Skakkebaek, N.E., *Androgens and the ageing male*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(5): p. 423-433.
74. Karila, T., *Adverse effects of anabolic androgenic steroids on the cardiovascular, metabolic and reproductive systems of anabolic substance abusers*, in *Institute of Biomedicine Pharmacology University of Helsinki*. 2003, University of Helsinki: Helsinki.
75. World Health Organization, *Prevention of Cardiovascular Disease: Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. 2007.
76. Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H., *The time has come to stop letting the HERS tale wag the dogma*. Circulation, 2001. **104**(19): p. 2256-9.
77. Barrett-Connor, E. and Goodman-Gruen, D., *The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **774**: p. 259-70.

78. Farrukh, I., et al., *Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca^{2+} -activated K^+ -channel opener*. American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology, 1998. **274**: p. L186–95
79. Gupte, S.A., et al., *Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(1): p. 299-305.
80. Hampl, V., et al., *Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2003. **21**(5): p. 862-5.
81. Bonnet, S., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9488-93.
82. Oka, M., et al., *Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(3): p. 377-387.
83. Lafayette, S.S.L., et al., *Evidence for the participation of calcium in non-genomic relaxations induced by androgenic steroids in rat vas deferens*. British Journal of Pharmacology, 2008. **153**(6): p. 1242-1250.
84. Stallone, J.N., Salisbury, R.L., and Fulton, C.T., *Androgen-receptor defect abolishes sex differences in nitric oxide and reactivity to vasopressin in rat aorta*. J Appl Physiol, 2001. **91**(6): p. 2602-10.
85. Costarella, C.E., et al., *Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **277**(1): p. 34-9.
86. Jones, R.D., et al., *Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse*. Eur J Endocrinol, 2003. **148**(1): p. 111-20.
87. Ding, A.Q. and Stallone, J.N., *Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K^+ channel activation*. J Appl Physiol, 2001. **91**(6): p. 2742-50.
88. Ceballos, G., et al., *Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(5): p. 691-7.
89. Teoh, H., Quan, A., and Man, R.Y., *Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 1010-8.
90. Tep-areenan, P., Kendall, D.A., and Randall, M.D., *Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(3): p. 735-40.
91. Jones, R.D., et al., *Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(6): p. 814-23.
92. Yue, P., et al., *Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta*. Circulation, 1995. **91**(4): p. 1154-60.
93. Murphy, J.G. and Khalil, R.A., *Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(1): p. 44-52.
94. Chou, T.M., et al., *Testosterone Induces Dilation of Canine Coronary Conductance and Resistance Arteries In Vivo*. Circulation, 1996. **94**(10): p. 2614-2619.

95. Honda, H., Unemoto, T., and Kogo, H., *Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1999. **34**(6): p. 1232-6.
96. Crews, J.K. and Khalil, R.A., *Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(9): p. 707-15.
97. Perusquia, M. and Villalon, C.M., *Possible role of Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5 β -dihydrotestosterone in rat aorta*. Eur J Pharmacol, 1999. **371**(2-3): p. 169-78.
98. Crews, J.K. and Khalil, R.A., *Antagonistic Effects of 17 β -Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Ca²⁺ Entry Mechanisms of Coronary Vasoconstriction*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. **19**(4): p. 1034-1040.
99. Deenadayalu, V.P., et al., *Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1720-7.
100. Schror, K., et al., *Testosterone treatment enhances thromboxane A₂ mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs*. Eur J Clin Invest, 1994. **24** Suppl 1: p. 50-2.
101. Farrukh, I.S., et al., *Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca(2+)-activated K(+)-channel opener*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. L186-95.
102. Cairrao, E., et al., *Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **376**(5): p. 375-83.
103. English, K.M., et al., *Testosterone acts as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action*. J Endocrinol Invest, 2002. **25**(5): p. 455-8.
104. Scragg, J.L., et al., *Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca(2+) channels*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(2): p. 503-6.
105. Jones, R.D., et al., *The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action?* Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 733-44.
106. Peng, W., Hoidal, J.R., and Farrukh, I.S., *Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 737-45.
107. Scragg, J.L., Dallas, M.L., and Peers, C., *Molecular requirements for L-type Ca²⁺ channel blockade by testosterone*. Cell Calcium, 2007. **42**: p. 11-15.
108. Molinari, C., et al., *The effect of testosterone on regional blood flow in prepubertal anaesthetized pigs*. J Physiol, 2002. **543**(Pt 1): p. 365-72.
109. Ferrer, M., et al., *Treatment with the anabolic steroid, nandrolone, reduces vasoconstrictor responses in rabbit arteries*. Eur J Pharmacol, 1994. **258**(1-2): p. 103-10.
110. English, K.M., et al., *Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries*. Horm Metab Res, 2001. **33**(11): p. 645-52.

111. English, K.M., et al., *Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone*. Clin Sci (Lond), 2000. **99**(1): p. 77-82.
112. Hall, J., et al., *Selective Inhibition of L-Type Ca^{2+} Channels in A7r5 Cells by Physiological Levels of Testosterone*. Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 2675-2680.
113. Jennings, L.J., et al., *Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 1): p. G1017-26.
114. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1981. **391**(2): p. 85-100.
115. Neher, E. and Sakmann, B., *The patch clamp technique*. Sci Am, 1992. **266**(3): p. 44-51.
116. Nobelprize.org, *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991*. 2009, Nobelprize.org.
117. Wikipedia, *Patch clamp*. 2009.
118. Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S., and Lyubarsky, A.L., *Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 310-3.
119. Nakamura, T. and Gold, G.H., *A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia*. Nature, 1987. **325**(6103): p. 442-4.
120. Guy, H.R., et al., *Similarities in amino acid sequences of Drosophila eag and cyclic nucleotide-gated channels*. Science, 1991. **254**(5032): p. 730.
121. Cheng, K.T., et al., *Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channel (CNGA2) in vascular tissues*. Histochem Cell Biol, 2003. **120**(6): p. 475-81.
122. Kaupp, U.B. and Seifert, R., *Cyclic nucleotide-gated ion channels*. Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 769-824.
123. Kramer, R.H. and Molokanova, E., *Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction*. J Exp Biol, 2001. **204**(17): p. 2921-2931.
124. Finn, J.T., Grunwald, M.E., and Yau, K.W., *Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions*. Annu Rev Physiol, 1996. **58**: p. 395-426.
125. Rich, T.C., et al., *Cyclic Nucleotide-gated Channels Colocalize with Adenylyl Cyclase in Regions of Restricted cAMP Diffusion*. J. Gen. Physiol., 2000. **116**(2): p. 147-162.
126. Rich, T.C., et al., *In Vivo Assessment of Local Phosphodiesterase Activity Using Tailored Cyclic Nucleotide-gated Channels as cAMP Sensors*. J. Gen. Physiol., 2001. **118**(1): p. 63-78.
127. Rich, T.C. and Karpen, J.W., *Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure?* Ann Biomed Eng, 2002. **30**(8): p. 1088-99.
128. Simoncini, T. and Genazzani, A. R., *Non-genomic actions of sex steroid hormones*. European Journal of Endocrinology, 2003. **148**: p. 281-292.
129. Tep-areenan, P., Kendall, D.A., and Randall, M.D., *Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta*. European Journal Pharmacology 2003. **465**: p. 125-132.
130. Won, E., et al., *Testosterone causes simultaneous decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels*. Yonsei Med J, 2003. **44**: p. 1027-1033.

131. Yildiz, O., et al., *Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **45**(6): p. 580-5.
132. Seyrek, M., et al., *Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action*. J Pharmacol Sci, 2007. **103**(3): p. 309-16.
133. Navarro-Dorado, J., et al., *Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilatation in pig prostatic small arteries*. Life Sciences, 2008. **83** p. 569–573.
134. Montan , L.M., et al., *Relaxation of Androgens on Rat Thoracic Aorta: Testosterone Concentration Dependent Agonist/Antagonist L-Type Ca^{2+} Channel Activity, and 5-Dihydrotestosterone Restricted to L-Type Ca^{2+} Channel Blockade*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2517–2526.
135. Orshal, J.M. and Khalil, R.A., *Gender, sex hormones, and vascular tone*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(2): p. R233-49.
136. Liu, P.Y., Death, A.K., and Handelsman, D.J., *Androgens and cardiovascular disease*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 313-40.
137. Barbagallo, M., et al., *Vascular Effects of Progesterone : Role of Cellular Calcium Regulation*. Hypertension, 2001. **37**(1): p. 142-147.
138. Cairrão, E., et al., *17  estradiol and progesterone inhibit L-type Ca^{2+} current of rat aorta smooth muscle cells*. Portugaliae electrochimica acta, 2006. **24**: p. 241-255.
139. Ruehlmann, D.O., et al., *Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca^{2+} channels in smooth muscle cells*. FASEB J., 1998. **12**(7): p. 613-619.
140. Rouillet, J.-B., et al., *Farnesol Inhibits L-type Ca^{2+} Channels in Vascular Smooth Muscle Cells*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(51): p. 32240-32246.
141. Rouillet, J.B., et al., *Farnesyl analogues inhibit vasoconstriction in animal and human arteries*. J Clin Invest, 1996. **97**(10): p. 2384-90.
142. Santos-Silva, A.J., et al., *PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries*. Eur J Pharmacol, 2008. **582**(1-3): p. 102-9.

Anexos



The vasorelaxant effect of testosterone and cholesterol in rat aorta is due to L-type calcium channels inhibition

Journal:	<i>Endocrine Research</i>
Manuscript ID:	LERC-2009-0031
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	17-Apr-2009
Complete List of Authors:	Alvarez, Ezequiel; University of Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde Cairrão, Elisa; University of Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde Morgado, Manuel; University of Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde Morais, Carla; University of Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde Verde, Ignacio; University of Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Keywords:	rat aorta, androgens, L-type calcium channels



The vasorelaxant effect of testosterone and cholesterol in rat aorta is due to L-type calcium channels inhibition

Álvarez E*, Cairrão E^{*#}, Morgado M*, Morais C*, Verde I^{*▶}.

* CICS – *Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior*,
Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.
Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E. Quinta do Alvito, 6200-251 Covilhã, Portugal.

RUNNING TITLE: Testosterone & cholesterol relaxation by LTCC inhibition

▶ to whom correspondence should be addressed:

Ignacio Verde, PhD
Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Universidade da Beira Interior
Av. Infante D. Henrique
6200-506 Covilhã
Portugal
Tel.: +351-275-329049
Fax: +351-275-329099
E-mail: iverde@fcsaude.ubi.pt

ABBREVIATIONS:

BAY: (-)-Bay K8644; BK_{Ca}: large conductance Ca²⁺-activated potassium channels; K_{ATP}: ATP-sensitive potassium channels; K_V: voltage-sensitive potassium channels; FBS: foetal bovine serum; I_{Ca,L}: Ca²⁺ current through L-type calcium channels; LTCC: L-type calcium channels.

ABSTRACT

Testosterone has rapid non-genomic vasodilator effects which could be involved in protective cardiovascular actions. Several authors suggested specific mechanisms to explain this effect, but this matter was not clarified yet. Other sex steroids, such as estradiol and progesterone, share the same vasodilator effect and the mechanisms proposed are similar. We studied the actions of testosterone and cholesterol on endothelium-denuded rat aorta and their effects on the L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca,L}}$) and potassium channels (I_{K}). Testosterone (1-100 μM) totally relaxed, in a rapid and concentration-dependent way, the aortic rings contracted by KCl or by (-)-Bay K8644 (BAY). Cholesterol also fully relaxed the contractions induced by KCl. None of the potassium channel antagonists tested (glibenclamide, tetraethylammonium and 4-aminopyridine) modified significantly the relaxant effect of testosterone. The antagonist of classic testosterone receptors, flutamide, did not modify the vasorelaxant effect of testosterone. Furthermore, testosterone and cholesterol inhibited either basal and BAY-stimulated $I_{\text{Ca,L}}$ in A7r5 cells and they have no effects on the I_{K} in A7r5 cells. In summary, our results demonstrate that cholesterol and testosterone relaxes rat aorta by inhibiting LTCC. This effect of testosterone is not mediated by the classic hormone receptor or by potassium channel activation. These results suggest that the vasodilator mechanism of cholesterol and testosterone is the same.

KEYWORDS: Testosterone; Cholesterol; Vasodilatation; Calcium channels; Potassium channels; Rat aorta

INTRODUCTION

Gender differences in the incidence of cardiovascular health problems were attributed to different sex hormonal patterns found in women and men. Androgens were associated with negative effects on the cardiovascular system, such as increased cardiovascular disease risk, thrombosis, cardiac hypertrophy, and suspected pro-atherogenic effects (1, 2). However, more recent studies illustrate that testosterone has some beneficial cardiovascular effects and several epidemiological studies also indicated that patients with cardiovascular diseases have low levels of testosterone (3-6).

In the last years, vasodilatation induced by testosterone has been shown in different vessels from different species (7, 8). This vasodilatation is not attenuated by pre-treatment with the classic androgen receptor blocker flutamide (9-11) and non-genomic testosterone analogues have also been shown to elicit greater vasodilatation than genomic-acting analogues (9, 12). Thus, the effect seems to be independent of the classical genomic signalling pathway, activated after androgen receptor activation, indicating a non-genomic mechanism of action. On the other hand, other sex steroids have the same effect than testosterone (13, 14), suggesting an unspecific effect of this group of substances. The effect of cholesterol on artery relaxation was never reported. However, farnesol, a non-sterol mevalonate derivative from the cholesterol synthesis pathway, was reported to inhibit L-type calcium channels (LTCC) in vascular smooth muscle cells (15, 16) and also induces relaxation of contracted rat aortic and human mesenteric arteries (17).

Studies performed with different rat vessels showed that removal of the endothelium slight reduces the testosterone relaxant effect in aorta (12) and mesenteric artery (10, 18). However, Yue et al. (1995) indicated that testosterone induces endothelium-independent relaxation in isolated coronary artery and aorta from rabbit (9).

Furthermore, testosterone induced relaxation of porcine coronary arteries was associated with accumulation of cGMP by an endothelium-independent mechanism (19). In general, the rapid vascular effects of testosterone suggest the involvement of mechanisms related with membrane receptors and independent of the classic genomic pathway (20, 21).

Concerning the testosterone modulation of membrane ionic fluxes in vascular smooth muscle cells, it was suggested that in rat aorta LTCC are inhibited by physiological concentrations of testosterone (22, 23), while T-type currents are only blocked at higher concentrations (23). Some authors also suggested that store-operated calcium channels are inhibited by testosterone in these vascular cells (24). On the other hand, the functional implication of potassium channels opening in the testosterone-induced vasodilatation has been proposed in arteries in rabbit coronary arteries (25), rat mesenteric arteries (10), rat aorta (26), human umbilical arteries (11) and human internal mammary arteries (27). Activation of potassium channels in vascular smooth muscle may induce hyperpolarization of plasma membrane, which leads to close LTCC and vascular relaxation. Honda et al. (1999) suggested that this could be a mechanism which is more significant in situations of systemic hypertension (26).

In summary, different pathways have been suggested to explain the vasodilator effect of testosterone, but a consensus between the investigators was not reached yet. Although the pathways implicated in the testosterone vasodilatation are still unclear, some works have reported, regardless of the specific site of action, the involvement of mechanisms related to some ionic channels. The purpose of this study was to analyse the mechanisms implicated in the testosterone vasodilator effect in smooth muscle of rat aorta. The responses of contracted endothelium-denuded rat aorta to testosterone and cholesterol were analysed. The whole cell configuration of the patch-clamp technique was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

used to analyse the effects of testosterone and cholesterol on the Ca^{2+} current through L-type calcium channels ($I_{\text{Ca,L}}$) and potassium channels (I_{K}) in A7r5 cells.

For Peer Review Only

METHODS

Rat aorta contractility experiments

Male adult Wistar rats (Charles-River, Barcelona, Spain) weighing 400-500 g were housed and acclimatized for at least one week before performing the experiments in appropriate laboratory installations with light cycles of 12 hours light: 12 hours dark and food and water *ad libitum*. The rats were used in accordance with the European regulations about protection of animals (Directive 86/609) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals promulgated by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

The rats were sacrificed by decapitation. After thoracotomy, the aortas were obtained, placed in a thermostated (37 °C) Krebs modified solution and the fat and connective tissue was cleaned. Vascular endothelium was mechanically removed by gentle rubbing with a cotton bud introduced through the arterial lumen. The artery rings were placed in an organ bath (LE01.004, Leticia) containing Krebs-bicarbonate solution at 37°C continuously gassed with carbogen. The composition of the Krebs' modified solution was (mM): NaCl 119, KCl 5, CaCl₂•2H₂O 0.5, MgSO₄•7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, EDTA-Na₂ 0.03, L-(+)-ascorbic acid 0.6 and glucose 11 (pH 7.4). The rings were suspended by two parallel stainless steel wires and tension measurement was performed using isometric transducers (TRI201, Panlab SA, Spain), amplifier (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments), interface PowerLab/4SP (ML750, ADInstruments) and computerised system with Chart5 PowerLab software (ADInstruments). During the resting periods, the organ bath solution was changed every 15 minutes.

Initially, the rings were equilibrated for 60 min until a resting tension of 1.0 g. After the equilibration period, aortic rings were firstly contracted with high isosmotic KCl concentrations (60 mM) and the absence of endothelium functionality was confirmed by

the lack of relaxant response to acetylcholine (1 μ M). After that, the arteries were washed and allowed to recuperate for at least 45 minutes before the next induced contraction. The rings were contracted using KCl (60 mM) or (-)-Bay K 8644 (BAY; 0.1 μ M) and vasorelaxation induced by testosterone (1–100 μ M) on these contractions was analysed. The contractions induced by BAY (0.1 μ M) were achieved after partial depolarization of the artery with KCl (10 mM). The effect of cholesterol (1–100 μ M) in the artery rings contracted with KCl (60mM) was also analysed. In some experiments, the involvement of the classical hormonal receptors in the vasorelaxant effects of testosterone was studied using flutamide, a specific antagonist for the classical hormonal receptor. In these cases, after contraction, the arteries were incubated 15 minutes with flutamide (10 μ M) and the effect of testosterone in the presence of this antagonist was analysed. To determine the role of potassium channels activation in testosterone effects, several potassium channel inhibitors were used in some experiments: tetraethylammonium (TEA; 1 mM), an inhibitor of BK_{Ca} ; glibenclamide (10 μ M), an inhibitor of K_{ATP} ; and 4-aminopyridine (4-AP; 1 mM), an inhibitor of K_v . In these cases, after contraction, the arteries were incubated 15 minutes with the potassium channel inhibitors and the effect of testosterone in presence of these drugs was analysed. Control experiments with ethanol, the vehicle used to dissolve the drugs, were always performed.

Cell culture of vascular smooth muscle cells

The A7r5 cell line, used in this study, is a commercial vascular smooth muscle cell line obtained from embryonic rata aorta (Promochem, Spain). The cells were grown in culture medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Hams (DMEF-F12; Sigma-Aldrich, Portugal) supplemented with $NaHCO_3$ (1.2 g/L), L-ascorbic acid (20 mg/L; Sigma-Aldrich), bovine serum albumin (0.5%; Sigma-Aldrich), heat-inactivated foetal

bovine serum (FBS; 10%; Biochrom) and a mixture of penicillin (100 u/mL), streptomycin (100 µg/mL) and amphotericin B (250 ng/mL) (Sigma-Aldrich). The cells were kept in culture at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. After confluence, the cells were placed in culture medium without FBS (FBS-free culture medium) for 24-48 hours. Trypsinization was made using a solution of trypsin (0.3%) in Ca²⁺-Mg²⁺-free phosphate buffered solution with EDTA (0.025%). Subsequently, the cells were kept at 4°C in FBS-free medium until the realisation of the electrophysiological experiments.

Electrophysiological experiments

The whole cell configuration of patch clamp technique was used to analyse the L-type calcium current ($I_{Ca,L}$) and the potassium current (I_K).

To analyse the $I_{Ca,L}$, the control external solution contained (mM): NaCl 124.0, CaCl₂ 5.0, HEPES 5.0, tetraethylammonium sodium salt (TEA) 10.0, KCl 4.7 and glucose 6.0, pH 7.4 adjusted with NaOH. Patch electrodes (2-4 MΩ) were filled with internal solution (mM): CsCl 119.8, CaCl₂ 0.06, MgCl₂ 4.0, Na-ATP 3.1, Na-GTP 0.4, EGTA 5.0, HEPES 10.0 and TEA 10.0, pH 7.3 adjusted with CsOH. The presence of Cs⁺ instead of K⁺ in the solutions blocked the potassium currents. The cells were maintained at a holding potential of -80 mV and routinely depolarised every 8 s to 0 mV test potential during 500 ms to measure $I_{Ca,L}$.

To analyse the I_K , the control external solution contained (mM): NaCl 134.3, CaCl₂ 1.0, HEPES 5.0, KCl 5.4 and glucose 6.0, pH 7.4 adjusted with NaOH. Patch electrodes (2-4 MΩ) were filled with internal solution (mM): KCl 125.0, MgCl₂ 1.0, Na-ATP 5.0, Na-GTP 0.5, EGTA 0.1, HEPES 20.0 and glucose 10.0, pH 7.3 adjusted with KOH. For I_K analysis we used the same holding potential and depolarizations to 60 mV for 300 ms were performed every 8 s.

Basal $I_{Ca,L}$ and I_K were measured 3-5 min after patch break to allow the equilibration between pipette and intracellular solutions. Currents were not compensated for capacitance and leak currents. All experiments were done at room temperature (21-25 °C) and the temperature did not vary by more than 1 °C in a given experiment. The cells were voltage clamped using the patch-clamp amplifier Axopatch 200B (Axon instruments, USA). Currents were sampled at a frequency of 10 kHz and filtered at 0.1 kHz using the analog-digital interface Digidata 1322A (Axon Instruments, USA) connected to a compatible computer with the Pclamp8 software (Axon Instruments, USA). The external solution was applied to the cell proximity by placing the cell at the opening of a 250 μ m inner diameter capillary tube flowing at a rate of 20 μ L/min. The basal and BAY-stimulated (10 nM) $I_{Ca,L}$ were studied in the presence of different concentrations of testosterone (1-100 μ M) and of cholesterol (1-100 μ M) dissolved in the external solution.

Drugs

All drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal), except 4-aminopyridine that was purchased from Biogen Científica (Madrid, Spain).

Flutamide, BAY, nifedipine, cholesterol and testosterone were initially dissolved in ethanol. 4-Aminopyridine, glibenclamide, apamin and tetraethylammonium were initially dissolved in deionised water. Appropriate dilutions in Krebs modified solution or in the corresponding electrophysiology external solution were prepared every day before the experiment. Final concentration of ethanol never exceeded 0.1% in the experiments.

Statistical analysis

Statistical treatment of data was performed using the SigmaStat Statistical Analysis System, version 1.00 (1992). Results are expressed as mean \pm SEM of n experiments. Comparison among multiple groups was analysed by using a one-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test to determine significant differences among the means. Comparison between two groups was analysed by using Students t-test. Probability levels lower than 5% were considered significant ($P < 0.05$).

In the contractility experiments, the relaxant responses induced by testosterone and cholesterol are expressed as a percent of the maximal contraction ($E_{\max} = 100\%$) produced by the corresponding vasoconstrictor agent. In these experiments, sigmoidal concentration-response curves for the vasorelaxant effects were fitted and IC_{50} values (i.e. concentrations inducing 50% of relaxation) were estimated for KCl- or BAY-induced contractions. The antagonist of classical androgen receptors, flutamide, relaxed by itself the arteries contracted by KCl, and in this case the maximal effect used to perform the concentration-response curves was the tension obtained in presence of flutamide.

The $I_{Ca,L}$ amplitudes were automatically calculated between the maximum current peak and the stable current plateau near the final of the every 8 s pulse. The $I_{Ca,L}$ variations induced by the different drugs used are expressed as a percent of the basal or BAY-stimulated $I_{Ca,L}$. The I_K variations are expressed as a percent of the basal I_K obtained by depolarization in the absence of any drug.

RESULTS

Vasorelaxant effects of testosterone and cholesterol in rat aorta

The rat aortic rings without endothelium were contracted by depolarisation with isosmotic KCl (60 mM) solution and by the calcium channel opener BAY (0.1 μ M). Maximal contractions elicited by KCl and BAY, 1174.4 ± 27.5 mg ($n = 54$) and 1293.6 ± 77.1 mg ($n = 18$) respectively, were not significantly different ($P > 0.05$, Student's t-test). These contractile effects were reversible after washing out with Krebs solution.

After obtaining stable contraction with KCl and BAY, the cumulative addition of testosterone (1-100 μ M) fully relaxed (100%) in both cases these contractions in a concentration dependent manner (Fig. 1A). The vasorelaxation induced by each concentration of testosterone was observed after 10-15 minutes. The use of testosterone did not injure the contractility properties of the artery because, after washing out, a second administration of the contractile agents elicited a similar contraction than the previous one ($P > 0.05$, data not shown). The maximal relaxation induced by testosterone was similar in arteries contracted by KCl or BAY (Fig. 1A). However, the IC_{50} obtained from KCl-contracted arteries is significantly bigger than the obtained from BAY-contracted arteries (Table 1).

Cholesterol (1-100 μ M) also induced concentration-dependent vasorelaxations of the rat aortic rings contracted by KCl. The maximal relaxing effect of cholesterol was similar than the elicited by testosterone ($P > 0.05$) (Fig. 1B). However, the IC_{50} for testosterone (29.88 ± 1.12 ; $n = 5$) was significantly bigger than the obtained for cholesterol (19.10 ± 2.58 ; $n = 6$) ($P < 0.05$, Student's t-test).

Ethanol, the vehicle used to dissolve testosterone and cholesterol, did not have significant relaxant effect at the concentrations used (data not shown).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
The vasorelaxant effects of testosterone in rat aorta could be mediated by the activation of the classical intracellular receptors. To test this possibility, the effect of flutamide (10 μ M) on the testosterone vasorelaxations was analysed. Initially, after contraction by KCl, the artery rings were exposed for 15 min to flutamide, which caused a significant relaxation on rat aortic rings ($54.8 \pm 2.7\%$). However, flutamide did not affect the vasorelaxant effects of testosterone, because the IC_{50} values obtained in the absence and in the presence of this antagonist were similar ($P > 0.05$, Student's t-test; Table 1). These results indicated that the vasorelaxant actions of the testosterone are not mediated by classical hormonal receptor activation.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
The effects of inhibitors of three different potassium channels (glibenclamide, 4-AP, and TEA) were also investigated in order to analyse the involvement of these channels in the relaxant mechanism of testosterone. The presence of glibenclamide, 4-AP or TEA did not have a significant effect on the contraction induced by KCl (data not show) and did not modify significantly the relaxant effect of testosterone (Fig. 2) ($P > 0.05$, one-way ANOVA with Dunnet's post hoc test). The IC_{50} values calculated for testosterone in the presence of anyone of the K^+ channel inhibitors did not differ significantly from the IC_{50} values calculated in the absence of the blockers ($P > 0.05$; Table 1). These results indicate that potassium channel blockage did not influence significantly the vasorelaxant effects of testosterone on rat aortic rings.

48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 ***Effects of testosterone and cholesterol on $I_{Ca,L}$ in A7r5 cells***

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
The whole-cell patch clamp technique was used to analyse calcium current through the LTCC ($I_{Ca,L}$) in A7r5 cells. The mean value of basal $I_{Ca,L}$ density was of 0.93 ± 0.05 pA/pF ($n = 91$). The application of BAY (10 nM; specific stimulator of LTCC) significantly stimulated the calcium current on $74.8 \pm 5.7\%$ ($n = 36$) above the basal level. On the

contrary, nifedipine (1 μ M; LTCC inhibitor) significantly reduced the current until a level of $20.6 \pm 2.2\%$ ($n = 8$) of the basal current ($P < 0.05$). Even so, the effects of BAY and/or nifedipine were completely reversible upon washout of the drug (Fig. 3). These results indicate that the current analysed is a LTCC current ($I_{Ca,L}$). Fig. 3 shows the time course of two experiments in which BAY (10 nM) stimulates basal $I_{Ca,L}$ (Fig. 3A) and nifedipine (1 μ M) inhibited both BAY-stimulated and basal (Fig. 3A and 3B respectively).

Like a proposed vasodilatatory mechanism of testosterone is the inhibition of LTCC, we tested the effect of this steroid on $I_{Ca,L}$. The Fig. 4A shows a typical experiment in which different concentrations (1-100 μ M) of testosterone inhibited the basal $I_{Ca,L}$ in a reversible way. Fig. 5A summarises the results of this type of experiments in which testosterone at different concentrations (1, 10, 30 and 100 μ M) inhibited basal $I_{Ca,L}$ in a concentration dependent manner. The effect of cholesterol on the basal $I_{Ca,L}$ was also analysed (Fig. 5A), and like testosterone, cholesterol (1-100 μ M) inhibited the basal $I_{Ca,L}$. Furthermore, cholesterol seems to have similar effects than testosterone on basal $I_{Ca,L}$. ($P > 0.05$, Student's t-test), even if the testosterone effects are bigger.

To further characterize the inhibitory effects of testosterone on vascular LTCC, we analyse their effect on the $I_{Ca,L}$ stimulated by the LTCC agonist BAY. Fig. 4B shows a typical experiment in which different concentrations (1 - 100 μ M) of testosterone reversibly inhibited the $I_{Ca,L}$ stimulated by BAY (10 nM). The inhibitory effect of testosterone on BAY-stimulated $I_{Ca,L}$ was dependent on the concentration. The 100 μ M concentration testosterone completely inhibited the stimulation of BAY reducing the $I_{Ca,L}$ below the basal $I_{Ca,L}$ levels (Fig. 5B). To further characterize the inhibitory effects of cholesterol on vascular LTCC, we also analyse their effect on the $I_{Ca,L}$ stimulated by BAY. Cholesterol inhibited BAY-stimulated $I_{Ca,L}$. The maximal concentration of cholesterol used inhibited on 73.9 ± 16.8 the BAY-stimulated $I_{Ca,L}$ (Fig. 5B). Ethanol (0.001-0.1%), the vehicle used to dissolve

testosterone and cholesterol did not affect basal or stimulated $I_{Ca,L}$ (data not shown). The effect of testosterone and cholesterol on BAY-stimulated $I_{Ca,L}$ is not significantly different ($P>0.05$, Student's t-test), even if the cholesterol effects are lower.

Effects of testosterone and cholesterol on I_K in A7r5 cells

The whole-cell patch clamp technique was used to analyse potassium current (I_K) in A7r5 cells. The mean value of basal I_K density was of 9.1 ± 1.4 pA/pF ($n = 34$). In order to determine the types of potassium channels that were responsible for the total current measured, we used selective blockers of different channels. The K_V channel blocker 4-AP reduced basal I_K on $35.8\pm2.9\%$ at +60 mV. TEA (1 mM), which is used as a BK_{Ca} channel blocker, reduced net current by $30.4\pm5.7\%$ at +60 mV (Fig. 6). We also tested the presence of the low conductance K_{Ca} channels using the selective blocker apamin (10 μ M), which induced a small reduction on the basal I_K ($9.8\pm2.5\%$). Glibenclamide, usually used as a K_{ATP} channel blocker also induced a small reduction on the I_K ($8.7\pm0.8\%$, $n=5$) (Fig. 6). The effects of the potassium channels blockers used were completely reversible upon washout of the drug. Thus, our data suggest that the potassium current measured is mainly constituted by potassium exit through K_V and BK_{Ca} channels.

In order to further characterize the vascular relaxant mechanism of testosterone, the effects of this steroid on A7r5 I_K were analyzed. The results show that different concentrations (1 - 100 μ M) of testosterone did not inhibit the I_K current (Table 2). Similar results were observed with different concentrations of cholesterol (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed the effect of testosterone on endothelium-denuded rat aorta contracted arteries and on the $I_{Ca,L}$ and I_K measured by whole cell voltage-clamp in A7r5 cells.

The testosterone relaxant effect was previously observed by other authors working with rat aorta (18, 26, 28, 29) and other arteries such as coronary artery from dog (30) and from humans (31), and human umbilical artery (11). The vasorelaxant effect of testosterone in rat denuded aortic rings contracted with KCl was concentration-dependent and the maximal relaxation effect obtained was 100%, data that are in agreement with the obtained by Tep-areenan et al. (2003) (18). Several authors suggested that this effect is partially dependent of the endothelium (10, 12, 18, 26). Our data show that, regardless of the endothelium role, the effect of testosterone is induced in absence of the endothelium, in agreement with other authors (9, 19, 29). We show that testosterone fully relaxed the arteries contracted either by KCl or BAY, although the IC_{50} is bigger for KCl contracted arteries. High extracellular KCl concentrations induce plasma membrane depolarization. This depolarization can activate voltage-dependent channels, among them LTCC which opening increases intracellular calcium levels and muscle contraction. BAY directly and specifically opens LTCC, equally inducing vascular smooth muscle contraction by intracellular calcium increase. Thus, these results show that testosterone inhibits KCl- and BAY-induced contractions and point to LTCC inhibition as cause of this effect, as previously suggested by other authors (32).

To confirm this, we performed patch clamp studies in A7r5 to analyse the testosterone effect on the activity of L-type calcium channels (LTCC). BAY, a known agonist of this type of channels, clearly stimulate the basal $I_{Ca,L}$, and nifedipine, a selective antagonist of LTCC, significantly blocked either basal or BAY-stimulated calcium current.

These data confirm that calcium current measured is due to calcium entry through LTCC. Our results also show a rapid concentration-dependent inhibitory effect of testosterone on basal $I_{Ca,L}$. Other authors suggested previously that, in A7r5 cells, testosterone inhibits LTCC at low concentrations (22, 33) and T-type calcium channels at higher concentrations (33). Our data also show, for the first time, that testosterone inhibits BAY-stimulated $I_{Ca,L}$, confirming the inhibitory properties of testosterone on rat aorta LTCC. The inhibitory effect of testosterone was rapid and reversible, and this effect disappeared after drug washing. These data suggest that testosterone effect is mediated by a non-genomic pathway. Previously, some authors described the existence of a non-genomic mechanism induced by sex steroids which regulates the vascular tone (34). Besides, the existence of and unknown receptor, not yet identified and placed in the cell surface or in the intracellular space, was suggested (35, 36). Also, testosterone could block LTCC by direct binding to the channels (37). On the other hand, Deenadayalu et al. showed that increase of cyclic nucleotide levels was associated with the vasodilator effects of testosterone in porcine coronary myocytes (19), suggesting an interaction of testosterone with the cyclic nucleotide pathway.

In contrast with the hypothesis about calcium channel inhibition, other investigators reported that the vasodilator effect of testosterone is due to the stimulation of potassium channels (12, 26). The activation of potassium channels in vascular smooth muscle may induce repolarization and closing of LTCC, contributing to vascular relaxation. The bibliographic data about the role of different potassium channels in the vasorelaxant effect of testosterone are controversial. Activation of BK_{Ca} channels has been implicated in the action of testosterone in rat mesenteric arterial bed (10, 25), in porcine coronary myocytes (19), in human internal mammary artery (27) and in human umbilical artery (11). The participation of K_v channels in the testosterone relaxing effect was reported in rat aorta

(12), rabbit coronary arteries (25) and human umbilical artery (11). Finally, Honda et al. suggested the participation of K_{ATP} channels in the relaxant effects of testosterone in both normal and hypertensive animals (26). We used different types of potassium channels inhibitors, to test the involvement of these channels in the testosterone effect. TEA, glibenclamide, and 4-AP did not significantly modified the vasorelaxant effects of testosterone suggesting that potassium channel opening is not involved in the rat aorta vasodilatation induced by testosterone. To further investigate the effect of testosterone on potassium channels, we performed patch clamp studies in A7r5. The current measured was significantly inhibited by the K_V channel blocker (4-AP) and by the BK_{Ca} channel blocker (TEA), but the low conductance K_{Ca} channel blocker (apamine) and the K_{ATP} channel blocker (glibenclamide) only have a small effect in potassium currents. Thus, our results showed that the potassium current in A7r5 cells is mainly due to K_V and BK_{Ca} . On the other hand, our data also show that testosterone failed to stimulate I_K in A7r5 cells, confirming the contractility data and demonstrating that potassium channels are not implicated in the testosterone vasorelaxant effect in rat aorta.

Several authors have suggested that testosterone-induced vasodilatation is not attenuated either by pre-treatment with the classic androgen receptor blocker flutamide (9-11). Also, polar, non-permeable testosterone analogues have been shown to elicit greater vasodilatation than non-polar, permeable analogues (12). Besides, testosterone-mediated vasodilatation is maintained in vessels with androgen receptor deficiency (37). Thus, the effect seems to be independent of the classical genomic signalling pathway and this effect is mediated by a different signalling pathway or an unknown receptor. Concerning the rat aorta, some authors observed that flutamide did not inhibit testosterone induced vasorelaxation (9, 18). Tep-areenan et al. also demonstrate that mifepristone (an unspecific steroid receptor antagonist) did not inhibit the testosterone effect (18). Our data

also show that the blockage of the intracellular testosterone receptor did not modify the vasorelaxant action of testosterone, confirming that the testosterone effect is independent of the androgen receptor. In contrast, Murphy et al. showed that the testosterone vasorelaxant effect in pig coronary artery is inhibited by flutamide (38). On the other hand, our data show that flutamide elicited an unexpected and direct relaxation of KCl-contracted arteries. In this sense, Iliescu et al. have previously shown a vasorelaxation effect induced by flutamide in rat aorta, and suggested that this effect is independent of the nuclear receptor activation and involves activation of the NO-cGMP pathway (39). Ba et al. also observed this effect in rat arteries and a bigger flutamide relaxation in arteries from males than from females, suggesting a sex dependent mechanism (40).

Several investigators observed that other sex steroids have the same vasodilator effect than testosterone (13, 14). Also, some of the mechanisms proposed to explain the vasodilator effects of these steroids are similar than that proposed for testosterone, such as inhibition of calcium entry by 17beta-estradiol and progesterone in pig coronary arteries (13), or inhibition of LTCC by estrogens in rat aorta (41). These data could suggest an unspecific effect of this group of substances. In fact, farnesol, a non-sterol mevalonate derivative and intermediate of the cholesterol synthesis pathway, was also reported to inhibit LTCC of vascular smooth muscle cells (15, 16) and also induces relaxation of contracted rat aortic and human mesenteric arteries (17). In order to investigate the specificity of the vasodilator effect of testosterone, we analysed the effect of cholesterol in rat aorta and in A7r5 cells. For the first time we show that cholesterol, like testosterone, fully relaxed the arteries contracted by KCl, although the testosterone IC_{50} was bigger. Regarding the cholesterol effects on ionic channels, also for the first time our results show that increasing concentrations of cholesterol inhibit basal and the BAY-stimulated $I_{Ca,L}$, indicating a similar effect than testosterone on these channels in rat aorta cells. Also, like

testosterone, cholesterol failed to modify the potassium current measured by patch clamp. These results, together with the data of other investigators, could suggest that testosterone and cholesterol share the same mechanism in rat aorta, related with the inhibition of L-type calcium channels.

In summary, our results show that testosterone inhibit $I_{Ca,L}$ in rat aorta vascular smooth muscle cells but not I_K and that the effect of testosterone is not mediated by the classic hormone receptor or by potassium channel activation. In addition, our results show that cholesterol has similar effects than testosterone in rat aorta, suggesting a common mechanism of action of both steroids that could be also shared by other steroids.

Acknowledgements

We thank the FCT (*Fundação para a Ciência e a Tecnologia*) which supported the fellowships SFRH/BPD/14458/2003 and SFRH/BDE/15532/2004.

REFERENCES

1. Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:562-570.
2. Melchert RB, Welder AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27:1252-1262.
3. Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 1996; 125:1-13.

4. English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart J* 2000; 21:890-894.
5. English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2000; 102:1906-1911.
6. English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS. Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99:77-82.
7. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 2003; 138:733-744.
8. Yildiz O, Seyrek M. Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115:1-6.
9. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995; 91:1154-1160.
10. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 2002; 135:735-740.
11. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2008; 376:375-383.
12. Ding AQ, Stallone JN. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol* 2001; 91:2742-2750.

1
2
3
4
5 13. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 β -Estradiol, progesterone, and
6 testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb*
7 *Vasc Biol* 1999; 19:1034-1040.
8
9
10
11 14. Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, et al. Vascular effects of progesterone :
12 role of cellular calcium regulation. *Hypertension* 2001; 37:142-147.
13
14
15 15. Rouillet JB, Luft UC, Xue H, et al. Farnesol inhibits L-type Ca^{2+} channels in vascular
16 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272:32240-32246.
17
18
19 16. Luft UC, Bychkov R, Gollasch M, et al. Farnesol blocks the L-type Ca^{2+} channel by
20 targeting the α_{1C} subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:959-966.
21
22
23 17. Rouillet JB, Xue H, Chapman J, McDougal P, Rouillet CM, McCarron DA. Farnesyl
24 analogues inhibit vasoconstriction in animal and human arteries. *J. Clin. Invest.* 1996;
25 97:2384-2390.
26
27
28
29 18. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to
30 testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2003; 465:125-132.
31
32
33 19. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes
34 coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel.
35 *Am J Physiol* 2001; 281:H1720-1727.
36
37
38 20. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of
39 steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52:513-
40 556.
41
42
43 21. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol*
44 *Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R233-249.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

22. Hall J, Jones RD, Jones TH, Channer KS, Peers C. Selective inhibition of L-type Ca^{2+} channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 2006; 147:2675-2680.
23. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca^{2+} channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:503-506.
24. Jones RD, Ruban LN, Morton IE, et al. Testosterone inhibits the prostaglandin $\text{F2}\alpha$ -mediated increase in intracellular calcium in A7r5 aortic smooth muscle cells: evidence of an antagonistic action upon store-operated calcium channels. *J Endocrinol* 2003; 178:381-393.
25. Won E, Won J, Kwon S, Lee Y, Nam T, Ahn D. Testosterone causes simultaneous decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels. *Yonsei Med J* 2003; 44:1027-1033.
26. Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34:1232-1236.
27. Yildiz O, Seyrek M, Gul H, et al. Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45:580-585.
28. Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW, Whittier FC. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277:34-39.
29. Perusquia M, Hernandez R, Morales MA, Campos MG, Villalon CM. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol* 1996; 27:181-185.
30. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 1996; 94:2614-2619.

31. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 1999; 100:1690-1696.

32. Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, et al. Effect of testosterone on intracellular Ca^{2+} in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 2001; 14:1273-1275.

33. Scragg JL, Dallas ML, Peers C. Molecular requirements for L-type Ca^{2+} channel blockade by testosterone. *Cell Calcium* 2007; 42:11-15.

34. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:281-292.

35. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16:2181-2187.

36. Michels G, Hoppe UC. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:182-198.

37. Jones RD, English KM, Jones TH, Channer KS. Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107:149-158.

38. Murphy JG, Khalil RA. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:44-52.

39. Iliescu R, Campos LA, Schlegel WP, Morano I, Baltatu O, Bader M. Androgen receptor independent cardiovascular action of the antiandrogen flutamide. *J. Mol. Med.* 2003; 81:420-427.

40. Ba ZF, Wang P, Kuebler JF, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Flutamide induces relaxation in large and small blood vessels. *Arch. Surg.* 2002; 137:1180-1186.

- 1
2
3
4 41. Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE. Environmental
5
6 estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca^{2+} channels
7
8 in smooth muscle cells. *FASEB J* 1998; 12:613-619.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLES

Table 1.

IC₅₀ values (μM) of testosterone relaxant effect on rat aortic rings contracted with BAY and with KCl (60 mM) alone or in the presence of the following drugs: the K_v channel blocker 4-aminopyridine (4-AP; 2 mM); the BK_{Ca} channel blocker tetraethylammonium (TEA; 1mM); and the K_{ATP} channel blocker glibenclamide (GLI; 10 μM); the testosterone receptor antagonists flutamide (10 μM). Each value represents the mean ± SEM from the number of experiments shown in brackets. *P<0.05 versus testosterone IC₅₀ obtained in KCl-contracted arteries, Student's t-test.

AGENTS	Testosterone IC ₅₀ (μM)
BAY	12.94 ± 1.92 (n = 6)*
KCl	29.88 ± 1.12 (n = 5)
KCl + TEA	23.60 ± 1.06 (n = 4)
KCl + 4-AP	31.24 ± 1.15 (n = 5)
KCl + GLI	27.87 ± 1.21 (n = 3)
KCl + Flutamide	20.67 ± 1.26 (n = 4)

Table 2.

Inhibitory effect of testosterone and cholesterol (1-100 μM) on A7r5 cells basal potassium current (I_K). Each value represents the mean of the % of variation of basal $I_K \pm \text{SEM}$ from the number of experiments shown in the brackets.

Concentration	TESTOSTERONE	CHOLESTEROL
1 μM	1.5 \pm 1.9% (n =10)	-1.8 \pm 1.9% (n =10)
10 μM	-0.8 \pm 2.3% (n =7)	-1.3 \pm 1.6% (n =10)
30 μM	-1.0 \pm 1.7% (n =9)	-0.0 \pm 0.9% (n =10)
100 μM	-6.8 \pm 3.3% (n =9)	1.4 \pm 0.8% (n =8)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Vasorelaxant effect of testosterone and cholesterol on rat aorta. A: Effect of cumulative concentrations of testosterone (1-100 μ M) on contractions elicited by KCl (60 Mm) and BAY (0.1 μ M). B: Effect of cumulative concentrations of testosterone and cholesterol (1-100 μ M) on contractions elicited by KCl (60 Mm). Each point represents the mean value and the vertical lines indicate SEM of at least 5 experiments. *P<0.05 versus testosterone effect on KCl contractions, Student's t-test.

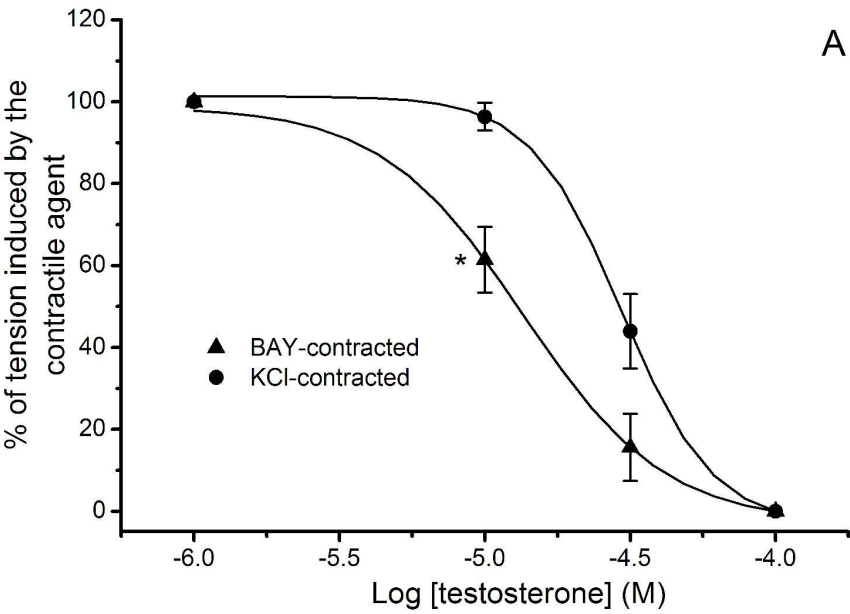
Figure 2. Effect of potassium channel inhibitors on rat aorta relaxation induced by testosterone. Effect of increasing concentrations of testosterone (1-100 μ M) in endothelium-denuded rat aortic rings contracted with KCl (60 mM) in presence or absence of the potassium channel inhibitors glibenclamide (GLI; 10 μ M), 4-aminopyridine (4-AP; 1 mM) or tetraethylammonium (TEA; 1mM). Each point represents the mean value \pm SEM (indicated in vertical bars) from the number of experiments shown in brackets.

Figure 3. Effect of nifedipine and BAY on $I_{Ca,L}$ amplitude in A7r5 cells. Original records of $I_{Ca,L}$ measured in Patch-clamp experiments showing that: BAY (10 nM) stimulates $I_{Ca,L}$ and nifedipine (Nif; 1 μ M) inhibits the BAY stimulation (A); Nifedidipe (1 μ M) directly inhibits the basal $I_{Ca,L}$ (B).

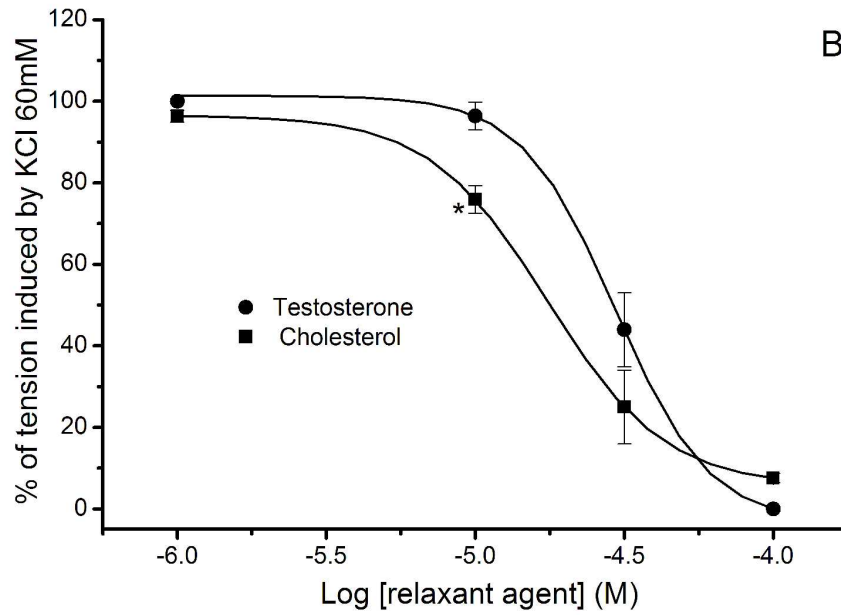
Figure 4. Effect of testosterone on $I_{Ca,L}$ amplitude in A7r5 cells. Original records of $I_{Ca,L}$ measured in Patch-clamp experiments showing that increasing concentrations of testosterone (TST; 10-100 μ M) inhibit basal $I_{Ca,L}$ (A) and BAY-stimulated $I_{Ca,L}$ (B).

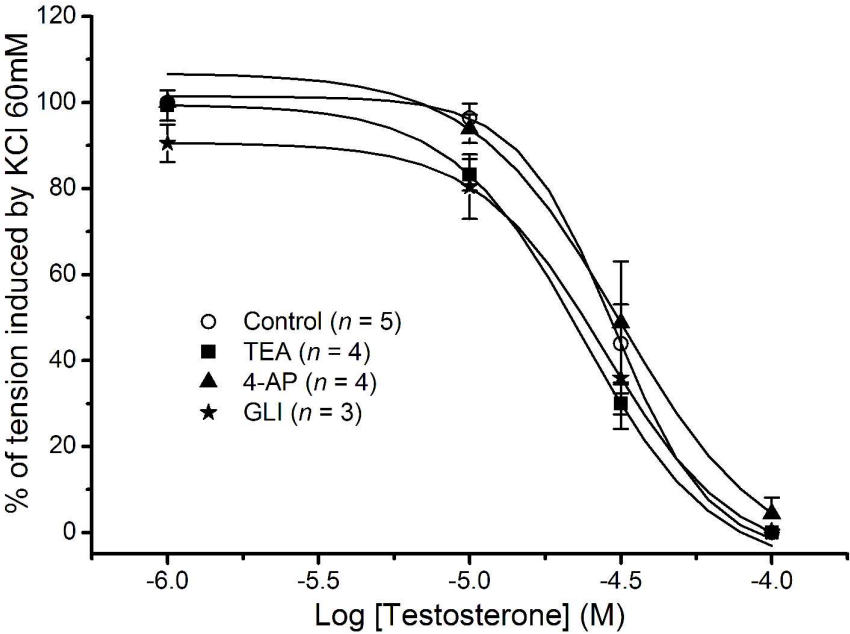
Figure 5. Effects of testosterone and cholesterol on $I_{Ca,L}$ in A7r5 cells. Different concentrations (1-100 μ M) of testosterone and cholesterol inhibit basal $I_{Ca,L}$ (A) and BAY-stimulated (10 nM) $I_{Ca,L}$ (B). Each column represents the mean value \pm SEM (indicated in vertical bars), in percent of the basal (A) or BAY-stimulated (B) $I_{Ca,L}$ from the number of experiments shown in brackets.

Figure 6. Effect of different potassium channel blockers on I_K in A7r5 cells. The bars represent the effect on I_K of the following potassium channel blockers: the K_V channel blocker 4-aminopyridine (4-AP; 2 mM); the BK_{Ca} channel blocker tetraethylammonium (TEA; 1mM); the low conductance K_{Ca} channels blocker apamin (APM, 10 μ M); and the K_{ATP} channel blocker glibenclamide (GLI; 10 μ M). Each column represents the mean value \pm SEM (indicated in vertical bars), in percent of the inhibition of I_K from the number of experiments shown in brackets.

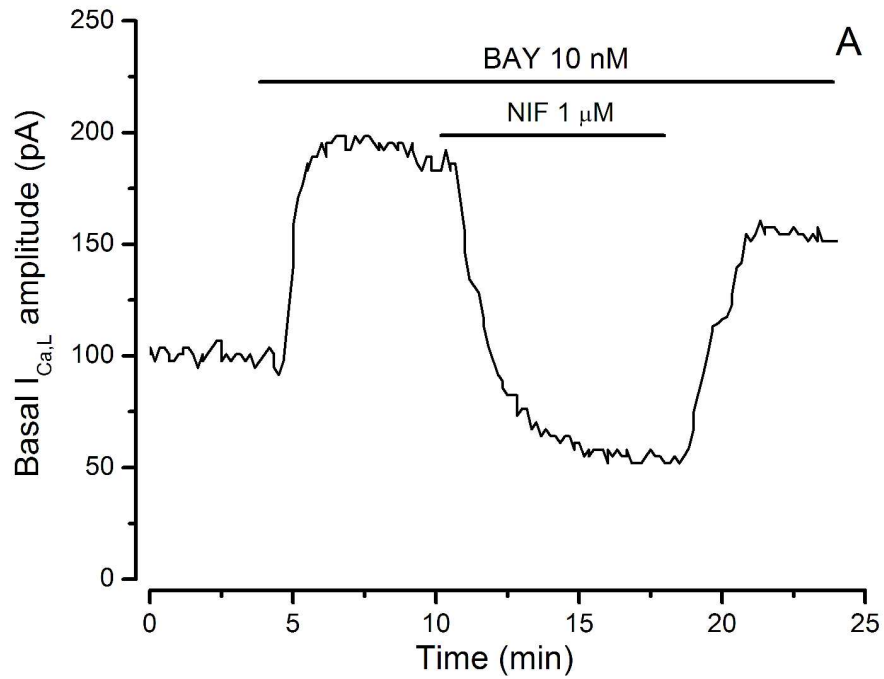


1202x839mm (72 x 72 DPI)



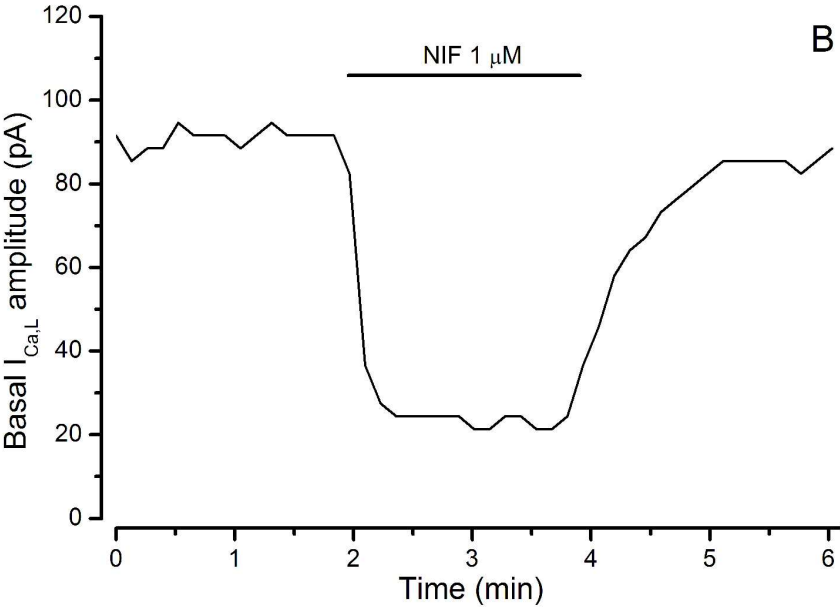


1172x850mm (72 x 72 DPI)

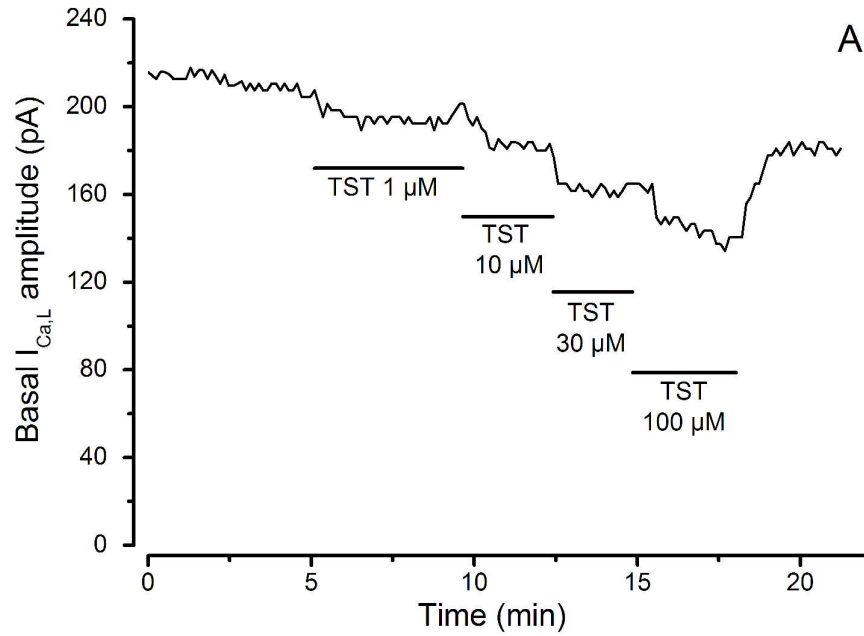


1121x860mm (72 x 72 DPI)

Manuscript Only

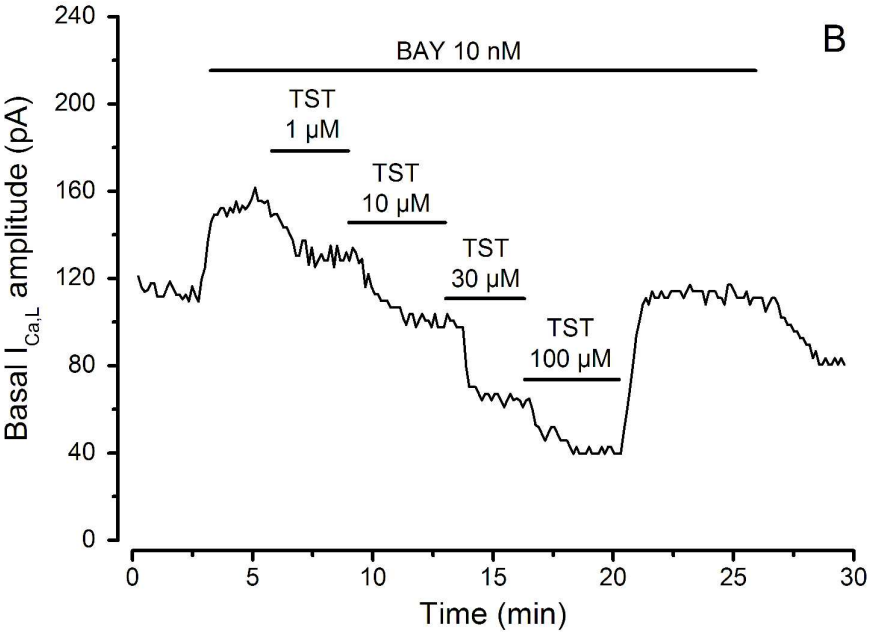


1202x839mm (72 x 72 DPI)

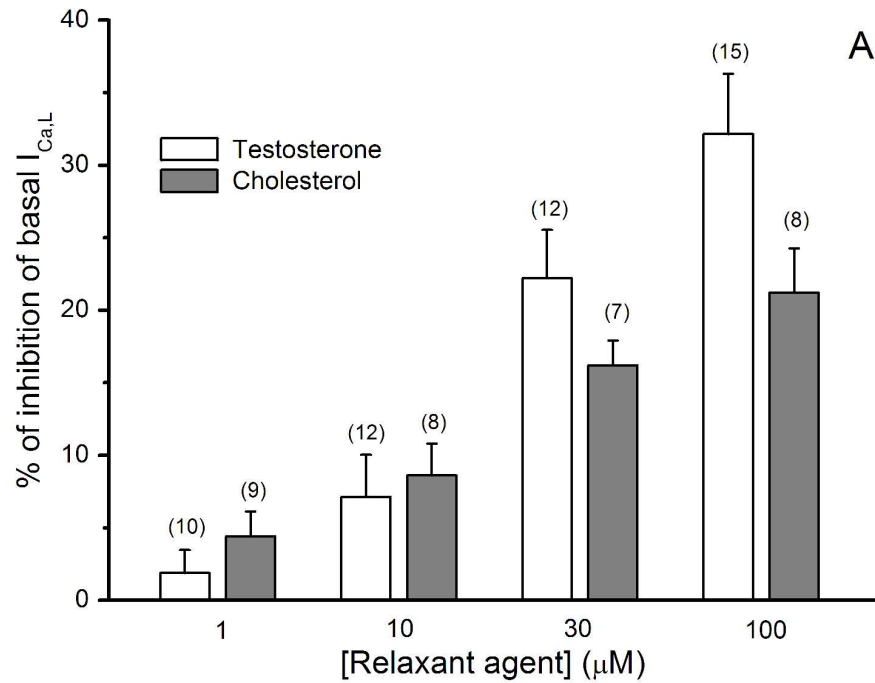


1172x850mm (72 x 72 DPI)

new Only

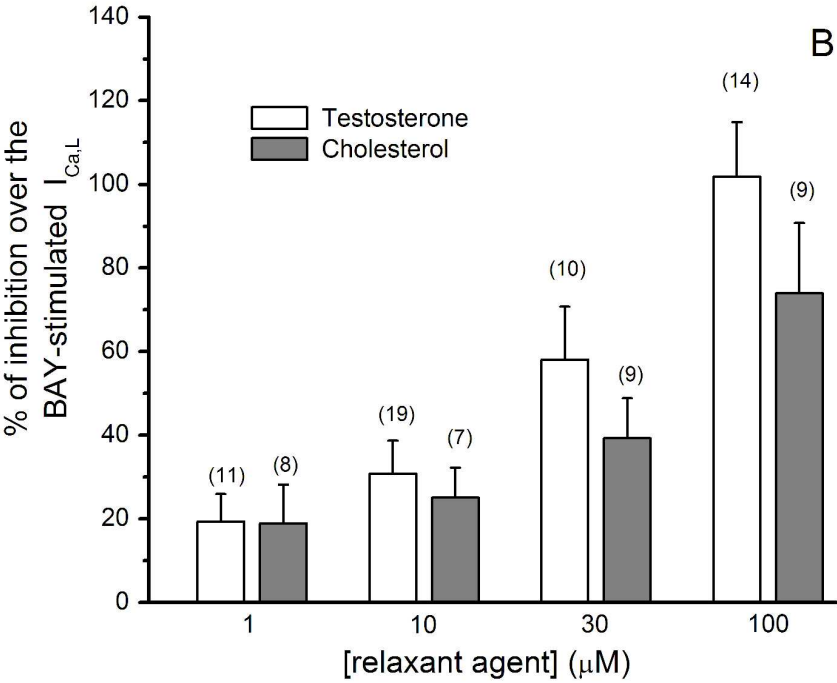


1172x850mm (72 x 72 DPI)

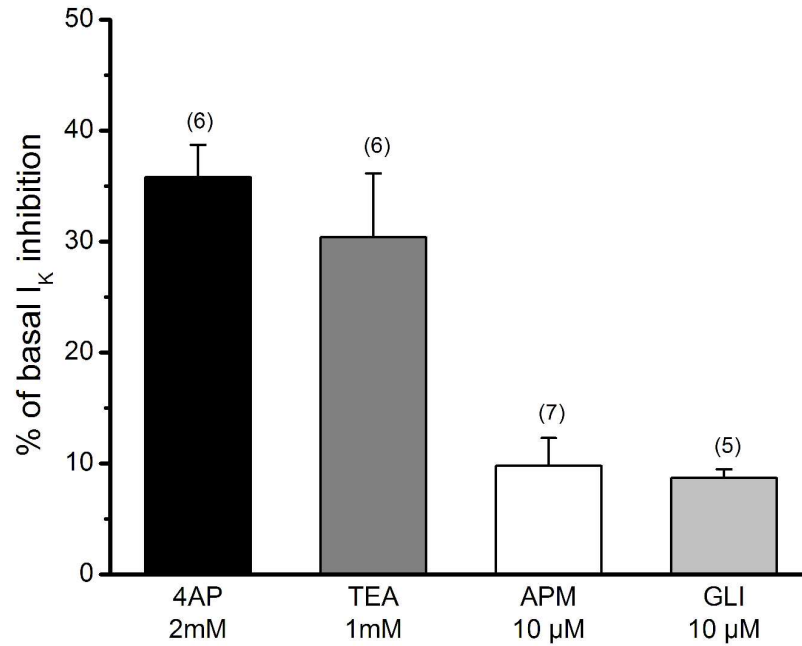


1164x899mm (72 x 72 DPI)

new Only



1164x899mm (72 x 72 DPI)



1164x899mm (72 x 72 DPI)